

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jana Mužíková

**Stanovení vybraných terpenoidů pomocí HPLC  
s elektrochemickou detekcí**

(Determination of selected terpenoids by HPLC with electrochemical  
detection)

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Hana Dejmková

Praha 2012

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Hance Dejmkové za skvělé vedení mé práce. Děkuji jí za poskytnuté rady a připomínky k mé práci, a hlavně za čas, který mi věnovala.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu, kterou mi poskytovali během celého studia.

Tato diplomová práce vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857), Univerzity Karlovy v Praze (projekt SVV 2012-263204) a Grantové agentury České Republiky (projekt P206/12/G151). Děkuji.

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá stanovením karvakrolu, thymolu a eugenolu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako pracovní elektrody byly použity uhlíková pastová elektroda a borem dopovaná diamantová filmová elektroda. Pro srovnání byla ještě vedle elektrochemické detekce použita UV spektrofotometrická detekce při vlnové délce 275 nm. K separaci byla použita kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m). Byly určeny optimální podmínky separace: mobilní fáze složená z acetonitrilu a acetátového pufru v poměru 50:50, optimální pH pufru bylo 5. Jako optimální potenciál pracovní elektrody byl zvolen potenciál +0,8 V v případě uhlíkové pastové elektrody a +1,2 V v případě borem dopované diamantové elektrody. U obou elektrod byla ověřena opakovatelnost měření, povrch obou elektrod bylo nutné během měření obnovovat. Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti. Studované látky byly vyvinutými metodami stanoveny v reálných vzorcích, a to v mateřidouce obecné a řebříčku obecném, dále pak v průduškovém čaji a v sirupu s mateřidouškou.

## **Klíčová slova:**

borem dopovaná diamantová filmová elektroda

elektrochemická detekce

eugenol

karvakrol

thymol

uhlíková pastová elektroda

UV spektrofotometrická detekce

HPLC

## **Abstrakt**

This thesis deals with the determination of carvacrol, thymol, and eugenol by HPLC with electrochemical detection. Carbon paste electrode and boron doped diamond film electrode were used as the working electrodes. For the comparison, UV spectrophotometric detection at 275 nm was used besides the electrochemical detection. The separation was performed on LiChroCART 125-4, RP-18e (5  $\mu$ m) column. Optimum separation conditions were found: mobile phase consisting of acetonitrile and acetate buffer in ratio 50:50, the optimum buffer pH was pH 5. The optimum potential of working electrode during electrochemical detection was +0,8 V and +1,2 V for carbon paste electrode and boron doped diamond film electrode, respectively. For both electrodes, repeatability of the measurement was examined; the surface of both electrodes had to be renewed between the measurements. Under the obtained optimum conditions, calibration dependences were measured. The studied substances were determined in real samples, in *Thymus vulgaris* L. and *Achillea millefolium* L. and in thyme-containing tea and syrup.

## **Key words:**

boron doped diamond film electrode

electrochemical detection

eugenol

carvacrol

thymol

carbon paste electrode

UV spectrophotometric detection

HPLC

## OBSAH

Seznam použitých zkratk .....	8
1. Teoretická část .....	9
1.1 Cíl práce.....	9
1.2 Vlastnosti terpenů .....	10
1.3 Eugenol.....	10
1.3.1 Vlastnosti a výskyt.....	10
1.3.2 Stanovení eugenolu podle Českého lékopisu <sup>10</sup> .....	11
1.4 Karvakrol a thymol .....	12
1.4.1 Vlastnosti a výskyt.....	12
1.4.2 Stanovení thymolu podle Českého lékopisu <sup>10</sup> .....	13
1.5 Metody stanovení eugenolu, karvakrolu a thymolu .....	14
1.6 Uhlíková pastová elektroda .....	16
1.7 Borem dopovaná diamantová elektroda.....	18
1.8 Shrnutí bakalářské práce .....	19
2. Experimentální část .....	20
2.1 Přehled studovaných látek.....	20
2.2 Reagencie.....	21
2.3 Reálné vzorky .....	21
2.4 Použité přístroje .....	22
2.5 Použité vzorce.....	23
2.5 Pracovní postupy.....	24
2.5.1 Optimalizace separace .....	24
2.5.2 Elektrochemická detekce .....	24
2.5.3 Aktivace povrchu BDDFE .....	24
2.5.4 Kalibrační závislosti .....	25
2.5.5 Stanovení studovaných látek v reálných vzorcích .....	25
3. Výsledky a diskuze.....	26
3.1 Vliv koncentrace acetonitrilu .....	26

3.2 Uhlíková pastová elektroda .....	28
3.2.1 Optimalizace elektrochemické detekce na CPE.....	28
3.2.2 Opakovatelnost měření s CPE.....	31
3.2.3 Kalibrační závislost na CPE.....	33
3.3 Borem dopovaná diamantová elektroda.....	36
3.3.1 Optimalizace elektrochemické detekce na BDDFE .....	36
3.3.2 Opakovatelnost měření s BDDFE .....	39
3.3.3 Kalibrační závislost na BDDFE .....	41
3.4 Spektrofotometrická detekce .....	44
3.4.1 Kalibrační závislost.....	44
3.5 Stanovení studovaných látek v reálných vzorcích .....	47
3.5.1 Stanovení v Mateřídoušce obecné .....	47
3.5.2 Stanovení v Řebříčku obecném.....	52
3.5.3 Stanovení v průduškové léčivé čajové směsi Pulmoran.....	57
3.5.4 Stanovení v sirupu s jitrocelem a mateřídouškou .....	62
4. Závěr .....	67
5. Seznam použité literatury .....	70

## Seznam použitých zkratk

$A$	absorbance
BDDFE	borem dopovaná diamantová filmová elektroda
$c$	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CPE	uhlíková pastová elektroda
$E$	potenciál
ED	elektrochemická detekce
FID	plamenově ionizační detektor
FIA	průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná kapalinová tenkovrstvá chromatografie
$I$	elektrický proud
$k$	retenční faktor
$L_D$	mez detekce
$L_Q$	mez stanovitelnosti
$M_r$	relativní molární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
$pK_a$	záporný logaritmus disociační konstanty
$P$	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
$R_{I,2}$	rozlišení píků
$R$	korelační koeficient
$s$	směrodatná odchylka
$S_r$	relativní směrodatná odchylka
$t_r$	retenční čas
$t_M$	mrtvý čas kolony
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
$w$	šířka píku při základně
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky



# **1. Teoretická část**

## **1.1 Cíl práce**

Terpeny jsou součástí esenciálních olejů rostlin. Vyskytují se v extraktech z rostlin, léčivech a dalších přípravcích a mají význam jako antibakteriální látky. Proto je zapotřebí nalézt vhodné podmínky umožňující jejich stanovení v nízkých koncentracích a komplikovaných maticích.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení vybraných terpenoidů (eugenol, karvakrol, thymol) pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí, konkrétně nalezením vhodných podmínek pro elektrochemickou detekci studovaných látek na uhlíkové pastové elektrodě a borem dopované diamantové filmové elektrodě. Dále se tato práce zabývala stanovením studovaných látek v reálných vzorcích.

## 1.2 Vlastnosti terpenů

Terpeny patří do velmi rozsáhlé třídy uhlovodíků a jsou primární složkou esenciálních olejů rostlin.<sup>1</sup> Významné jsou především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, zajišťují komunikaci mezi rostlinami, chrání rostlinu před vysycháním, napadením škůdci či lákají opylující hmyz. Pro své aroma se využívají v potravinářství, kosmetice a farmacii. Dále se dají využít jako insekticidy a herbicidy. Terpeny přispívají např. k vůni skořice, hřebíčku, citronu nebo zázvoru.<sup>2,3</sup>

Bohatými zdroji terpenů jsou byliny, koření, esenciální oleje (silice) a olivový olej. Řada terpenů má pozitivní vliv na lidské zdraví. Silice i jednotlivé terpeny se používají jako pomocné prostředky při léčení fyzických i psychických nemocí a poruch (aromaterapie), ale rovněž jako preventivní prostředky proti nachlazení a chřipce. Některé mají i protinádorové účinky a vykazují protiplísňové a antibakteriální účinky.<sup>4</sup>

## 1.3 Eugenol

### 1.3.1 Vlastnosti a výskyt

Eugenol má dezinfekční a antibakteriální účinky<sup>5</sup>, jde o lokální antiseptikum a analgetikum.<sup>6</sup> Vyskytuje se v některých bylinách, se kterými se u nás běžně setkáváme, například v řebříčku obecném (*Achillea millefolium*). Pro medicínské účely slouží kvetoucí natě, které obsahují nejvyšší podíl éterických olejů – eugenol, kafr, pinen a cineol. Řebříček představuje léčivou bylinu s mnohostranným využitím při poruchách trávení, menstruačních potížích a při ošetření ran. Působením obsažených éterických olejů dochází ke zmírnění zánětů a uvolnění křečí, bylina působí také antibakteriálně. Další bylinou s obsahem eugenolu je hřebíčkovec kořený (*Syzigium aromaticum*). Jedná se o léčivou rostlinu s protizánětlivými a analgetickými účinky. Obsažený eugenol funguje jako lokální anestetikum a zároveň vykazuje antiseptické vlastnosti. V menší míře obsahují eugenol také další byliny, jako jsou např. mateřídouška obecná, dobromysl obecná či skořicovník cejlonský.<sup>7</sup> Eugenol je také přítomen v muškátovém oříšku. Dále se eugenol vyskytuje ve většině komerčně vyráběných otiskovacích hmot ve stomatologii, jedná se o zinkoxid-eugenolové

otiskovací hmoty, také se vyskytuje v parfémových směsích<sup>8</sup> a je používán jako insekticid proti moskýtům.<sup>9</sup>

Vlastnosti eugenolu dle Českého lékopisu: bezbarvá nebo světle žlutá čirá kapalina, na vzduchu tmavnoucí, výrazného pachu po hřebíčku, je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v 70% ethanolu, prakticky nerozpustný v glycerolu, mísitelný s kyselinou octovou, s 96% ethanolem, s etherem, s mastnými oleji a s dichlormethanem.<sup>10</sup>

### 1.3.2 Stanovení eugenolu podle Českého lékopisu<sup>10</sup>

Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití desky s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Zkoušený roztok.* 50 µl se rozpustí v 96% ethanolu a zředí se jím na 25 ml.

*Porovnávací roztok.* 50 µl eugenolu CRL se rozpustí v 96% ethanolu a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů ethylacetatu R a toluenu R (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Vrstva se postříká anisaldehydem RS a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C.

Příbuzné látky: -stanoví se plynovou chromatografií

*Zkoušený roztok.* 1,00 g se rozpustí v ethanolu R a zředí se jím na 5,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí ethanolem R na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 50 mg vanilinu R se rozpustí v 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se ethanolem R na 5 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,25 mm s vnitřním povrchem pokrytým polyfenylmethylsiloxanem R (tloušťka filmu 0,25 µm)
- helia pro chromatografii R jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1 ml/min
- plamenoionizačního detektoru
- dělicího poměru 1 : 40

Nastříkne se po 1 µl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a) a (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je relativní retenční čas vanilinu vzhledem k eugenolu nejméně 1,1. Vypočítá se obsah příbuzných látek v procentech z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace. Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům s plochou menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Obsah příbuzných látek s relativním retenčním časem větším než 2,0 vzhledem k hlavnímu píku není větší než 1,0 %; obsah jiných příbuzných látek není větší než 0,5 %; celkový obsah příbuzných látek není větší než 3,0 %.

## 1.4 Karvakrol a thymol

### 1.4.1 Vlastnosti a výskyt

Karvakrol a thymol jsou příbuzné látky a obvykle se vyskytují pohromadě. Mají antibakteriální a antiseptické účinky.<sup>5</sup> Jsou obsaženy v mnoha bylinách, se kterými se běžně setkáváme. Pro příklad lze uvést dobromysl obecnou (*Origanum vulgare*). Nať dobromysli obsahuje 0,2-1,5 % silice – především karvakrol, thymol a 1,8-cineol, které podporují trávení, uvolňují křeče a přinášejí celkové uklidnění. Pomáhají především při zažívacích potížích provázených křečovitými stavy a průjmy, kromě toho ničí choroboplodné zárodky a rozpouštějí hleny. Dále lze uvést mateřídoušku obecnou (*Thymus vulgaris*). Rostliny z tohoto rodu vykazují spasmolytické a antiseptické účinky, používají se jako léky proti kašli – jsou součástí sirupů a kapek usnadňujících odkašlávání a společně s dalšími siličnými drogami jsou součástí průduškových čajových směsí. K léčebným účelům se ručně sbírá nať, která obsahuje 0,1-0,6 % silice, hlavní složky jsou: thymol (20-40 %), karvakrol (kolem 15 %), *p*-cymol, linalool. Zevně se používá při zánětech a vnitřně při onemocněních dýchacích cest či při poruchách trávení. Thymol a karvakrol potlačují růst bakterií, virů i hub, a likvidují tak nejběžnější původce infekčních onemocnění dýchacích cest.<sup>7</sup> Thymol je účinné antiseptikum, uplatňuje se v zubním lékařství, při výrobě past a ústních vod, jako prostředek odstraňující zápach. Thymol se také používá jako insekticid proti moskýtům.<sup>9</sup> Ve velkých dávkách je však toxický, poškozuje štítnou žlázu. Karvakrol a thymol můžeme dále nalézt např. v saturejce zahradní, řebříčku obecném, majoránce obecné či kmínu.<sup>11</sup>

Dalšími přípravky, které karvakrol či thymol obsahují, jsou různé doplňky stravy, čaje a rostlinné extrakty. Karvakrol a thymol také tvoří složky mastí, používaných při revmatismu.<sup>7</sup>

#### **1.4.2 Stanovení thymolu podle Českého lékopisu<sup>10</sup>**

Příbuzné látky: -provede se plynová chromatografie

*Zkoušený roztok.* 0,100 g se rozpustí v lihu 96% R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí lihem 96% R na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí lihem 96% R na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí lihem 96% R na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- sldené nebo ocelové kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné křemelinou pro plynovou chromatografii R impregnovanou směsí vhodnou pro dělení volných mastných kyselin
- dusíku pro chromatografii R jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min
- plamenoionizačního detektoru

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 250 °C a teplota detektoru na 300 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 µl každého roztoku. Po 2 min se zvýší teplota kolony rychlostí 8 °C/min na 240 °C, při níž se udržuje 15 min.

## 1.5 Metody stanovení eugenolu, karvakrolu a thymolu

Eugenol, karvakrol a thymol jsou deriváty monoterpenů, které mají antibakteriální účinky, jsou součástí různých léčivých přípravků a proto je jejich analýza v nízkých koncentracích důležitá.

Studované látky mohou být izolovány různými metodami, např. lisováním, destilací s vodní parou nebo extrakcí do organického rozpouštědla.<sup>3</sup> K extrakci těchto látek můžeme použít maceraci, extrakci pomocí ultrazvuku nebo pomocí mikrovlnné extrakce. Macerace v porovnání s extrakcí pomocí ultrazvuku a mikrovlnnou extrakcí poskytuje nejlepší výsledky.<sup>12</sup>

Studované látky se nacházejí v potravinách i farmaceutikách, proto bylo publikováno mnoho metod, které popisují jejich stanovení v různých matricích. Ke stanovení studovaných látek se používá řada instrumentálních metod, např. spektrometrické<sup>13</sup> a elektrochemické<sup>14</sup>, nad kterými ovšem převládají metody separační, především chromatografické. Mezi nejpoužívanější chromatografické metody patří plynová chromatografie<sup>15,16</sup> a vysokoúčinná kapalinová chromatografie<sup>12,17-20</sup>. K detekci studovaných látek v plynové chromatografii je možné použít např. hmotnostní detektor<sup>21,22</sup> či plamenově ionizační detektor.<sup>15,16</sup> Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením studovaných látek je uveden v tab.1.1.

**Tab.1.1** Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením studovaných látek

analyt	metoda	mez detekce $L_D$ , g/ml	citace
eugenol	HPLC	$1 \cdot 10^{-9}$	
	UV detekce, $\lambda = 280$ nm		17
eugenol	GC	-	15
	detektor: FID		
eugenol	IR-spektrometrie	-	13
eugenol	GC-MS	$2 \cdot 10^{-8}$	21
karvakrol, thymol	HPLC	karvakrol: $2 \cdot 10^{-8}$	
	UV detekce, $\lambda = 283$ nm	thymol: $1,5 \cdot 10^{-7}$	18
karvakrol, thymol	HPTLC	$4,30 \cdot 10^{-7}$	12
karvakrol, thymol	GC/MS	-	22
karvakrol, thymol	HPLC	karvakrol: $10 \cdot 10^{-9}$	19
	ED detekce	thymol: $14 \cdot 10^{-9}$	
karvakrol, thymol	GC	karvakrol: $2,3 \cdot 10^{-4}$	16
	Detektor: FID	thymol: $1,87 \cdot 10^{-3}$	
karvakrol, thymol	diferenční pulsní voltametrie	$4 \cdot 10^{-8}$	14
karvakrol, thymol,	HPLC	karvakrol: $2 \cdot 10^{-8}$ (220 nm)	
	UV detekce, $\lambda = 220$ nm	$1,2 \cdot 10^{-7}$ (283 nm)	
	a $\lambda = 283$ nm	thymol: $2 \cdot 10^{-8}$ (220 nm)	20
		$1,0 \cdot 10^{-7}$ (283 nm)	

## 1.6 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) jsou běžně a široce využívány v současné elektrochemii a umožňují detekci oxidovatelných i redukovatelných látek ve vodném i nevodném prostředí. CPE jsou využívány pro své atraktivní vlastnosti, spojené s variabilitou volby jejich složení, kdy zvláště modifikace chemickými či biologickými činidly významně zvyšuje selektivitu i citlivost elektrochemických metod stanovení organických i anorganických analytů.<sup>23</sup>

Uhlíková pasta, kterou jsou CPE tvořeny, je připravena ze dvou hlavních složek, a to z uhlíkového prášku a vhodného kapalného pojiva. Pro přípravu dvousložkových (tzv. nemodifikovaných) uhlíkových past se běžně používají spektrální grafitové prášky, které vyhovují z pohledu vysoké chemické čistoty, snížené absorpční schopnosti a uniformní distribuce velikosti částic. Jako pojivo obsahují uhlíkové pasty nejčastěji organickou kapalinu, jejíž hlavní funkcí je mechanické spojení grafitových částic. Postupně se v praxi osvědčila řada látek, především tzv. parafrinové (resp. minerální) oleje. Často doporučované jsou i silikonové oleje a tuky a uplatnění nacházejí i organické estery či halogenované uhlovodíky. Typické parametry kapalných pojiv pro přípravu past jsou netečnost a elektroinaktivita, vysoká viskozita a malá tekavost, minimální rozpustnost ve vodě, snížená mísitelnost s organickými rozpouštědly. Pasty z grafitového prášku a parafrinového oleje jsou nevhodné pro použití pro průtokové měření či ve spojení s HPLC, kde jsou jako mobilní fáze používány methanol, acetonitril atd. Proto se v těchto metodách používá kombinace skelného uhlíku a parafrinového oleje.<sup>24-27</sup> Kromě již zavedených uhlíkových elektrodových materiálů se na scéně objevují stále nové materiály na bázi uhlíku, jako např. retikulární skelný uhlík, uhlíkové nanotrubičky, grafen, naprášený nanouhlíkový film, uhlíková nanovlákná apod.<sup>28</sup>

Uhlíkovou pastu lze snadno modifikovat přimícháním vhodného modifikátoru. Způsobů modifikace je mnoho, dá se modifikovat uhlíkový prášek, pojivo, ale i povrch elektrody.<sup>29</sup> Modifikace může být provedena zabudováním vhodného modifikátoru do polymerního filmu pokrývajícího elektrodu, který lze vytvořit nanesením roztoku polymeru na povrch elektrody. V úvahu přichází i kovalentní (chemické) navázání modifikátoru na povrchu elektrody, fyzikální adsorpce či spontánní chemisorpce



modifikátoru. Zajímavé možnosti nabízí i modifikace samoskladnými vrstvami, různými nanočásticemi, nanotrubičkami apod.<sup>28</sup>

Interakce na povrchu a uvnitř uhlíkové pasty jsou elektrolytické děje spojené s výměnou elektronů (oxidace a redukce), adsorpce na povrchu uhlíkových past, dále extrakce do nitra uhlíkových past či tvorba iontových párů a jejich selektivní zachycování na uhlíkové pastě.<sup>27</sup>

Připravená uhlíková pasta se plní do těla elektrody tak, aby nevznikly vzduchové bubliny a pasta vyplnila celý objem těla elektrody. Naplněná elektroda se nenechává volně na vzduchu, protože zvolna vysychá. Mezi měřeními se elektroda přechovává ponořená koncem do destilované vody. Výhodou CPE je široké potenciálové okno, nižší zbytkový proud a snadná obnova povrchu výměnou pasty. Nevýhodou CPE je horší reprodukovatelnost, omezené použití pro katodické redukce, nižší mechanická a chemická odolnost.<sup>30,31</sup>

## 1.7 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou a chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití je nutné jej dopovat atomy jiných prvků.<sup>32</sup> Dopován je nejčastěji atomy boru a podle koncentrace dopantu lze získat diamant s polovodivými nebo polokovovými vlastnostmi. Ačkoliv byly studovány i jiné typy dopantů (vodík, dusík, fosfor, síra), většina prací v elektroanalýze využívá jako dopant bor.<sup>33</sup>

Nejčastěji jsou diamantové elektrody používány ve formě tenkých polykrystalických filmů. Diamantové filmy se připravují chemickou depozicí par při použití žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. K depozici se nejčastěji používá směs methanu a vodíku. Dopování borem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů, případně je možno použít pevný nitrid boru. Jako nosič se nejčastěji používá destička z křemíku s nízkým odporem, lze použít i wolfram nebo molybden. Destičku je nutno předem očistit a přeleštit brusnou směsí složenou z diamantového prášku a  $B_2O_3$ .<sup>34,35</sup>

Díky malé náchylnosti k pasivaci jsou BDD filmy v mnoha případech ideálním elektrodovým materiálem, který je možné použít k vysoce citlivému stanovení velkého množství organických i anorganických látek bez předchozí úpravy povrchu elektrody. Pro použití BDDFE v elektrochemii organických látek existují dva hlavní směry: elektrochemická oxidace organických látek obsažených v odpadních vodách na BDD anodě směřující k jejich úplné konverzi nebo destrukci a užití BDDFE jako elektrochemických senzorů ve voltametii nebo při amperometrické detekci v průtokových metodách (HPLC, FIA, kapilární elektroforéza).<sup>36</sup>

Hlavní výhody, které činí borem dopovaný diamant neobyčejně perspektivním materiálem jsou hlavně nízká kapacita elektrické dvojvrstvy mající za následek nízký zbytkový proud a velmi malý šum, široké potenciálové okno (zhruba od -1,5 V do +1,5 V), nízká adsorpce látek na elektrodovém materiálu, mechanická robustnost a stabilita umožňující využití těchto elektrod v průtokových metodách a biokompatibilita umožňující využití těchto elektrod v živé tkáni s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy.<sup>37</sup>

Poslední dobou roste využití modifikovaných diamantových povrchů. Techniky modifikace jsou chemické, elektrochemické nebo fotochemické. Chemická modifikace BDD povrchu může zajistit zvýšenou citlivost a selektivitu pro detekci různých látek.<sup>38</sup>

## 1.8 Shrnutí bakalářské práce

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci<sup>39</sup>, která se zabývala stanovením karvakrolu ve směsi s eugenolem a thymolem pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda. K separaci byly použity kolony Kromasil-C18, 250x4,6 mm. Pro srovnání byla ještě vedle elektrochemické detekce použita UV spektrofotometrická detekce při vlnové délce 275 nm. Byly stanoveny optimální podmínky separace: mobilní fáze složená z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 60:40. Bylo zjištěno, že pH nemá téměř žádný vliv na retenční charakteristiky studovaných látek. Vliv pH na odezvu CPE byl prostudován voltametriky, jako optimální pH bylo zvoleno pH 4. Z hydrodynamických voltamogramů byl jako optimální potenciál pracovní elektrody při elektrochemické detekci nalezen potenciál +1,1 V. Na základě získaných informací byly proměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti. Mez stanovitelnosti pro karvakrol byla  $9,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  při použití UV spektrofotometrické detekce a  $4,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$  při použití elektrochemické detekce. Byla prostudována stálost zásobních roztoků a bylo zjištěno, že roztoky studovaných látek jsou stále nejméně 77 dní.

## 2. Experimentální část

### 2.1 Přehled studovaných látek

**Eugenol** (99%, Janssen Chimica, Belgie)

systematický název: 2-methoxy-4-allylphenol

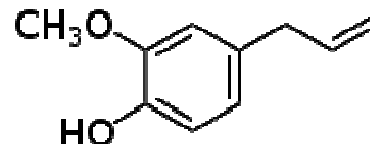
$C_{10}H_{12}O_2$

C.A.S číslo: 97-53-0

$M_r = 164,20$

$\log P = 2,204 \pm 0,235$

$pK_a = 10,29 \pm 0,18$



**Karvakrol** (98%, Sigma-Aldrich, Německo)

systematický název: 5-isopropyl-2-methylphenol

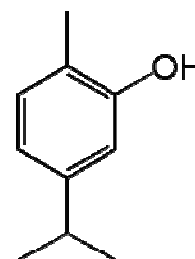
$C_{10}H_{14}O$

C.A.S číslo: 499-75-2

$M_r = 150, 217$

$\log P = 3,281 \pm 0,204$

$pK_a = 10,37 \pm 0,10$



**Thymol** (Thymolum, Tamda a.s., Olomouc)

systematický název: 2-isopropyl-5-methylphenol

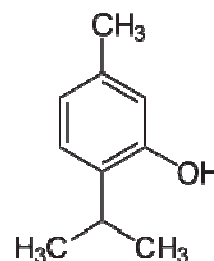
$C_{10}H_{14}O$

C.A.S číslo: 89-83-8

$M_r = 150, 22$

$\log P = 3,281 \pm 0,204$

$pK_a = 10,59 \pm 0,10$



Zásobní roztoky těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství dané látky v acetonitrilu. Roztoky o nižších koncentracích byly získány přesným ředěním zásobních roztoků.

## 2.2 Reagencie

- acetonitril (gradient grade, Lichrosolv, Merck, Německo)
- kyselina octová (99 % p.a., Lach-Ner, Neratovice)
- kyselina dusičná (p.a., Lachema n.p., Brno)
- hydrogenfosforečnan sodný (p.a., Lachema a.s., Neratovice)
- kyselina fosforečná (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
- hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)
- dusičnan draselný (p.a., Lachema n.p., Brno)
- minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)
- mikrokuličky skelného uhlíku (Alpha Aesar, USA)
- deionizovaná voda (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA)

## 2.3 Reálné vzorky

- Mateřídoušková nať (Megafyt-R spol.s.r.o., Česká republika)
- Řebříčková nať (Megafyt-R spol.s.r.o., Česká republika)
- Vincentka sirup s mateřídouškou a jitrocelem (Vincentka a.s., Česká republika)
- Pulmoran-průdušková léčivá čajová směs (Leros s.r.o., Praha)

Mobilní fáze byly připraveny smísením příslušných objemových dílů vodné složky a acetonitrilu. pH mobilní fáze bylo upravováno pomocí fosforečnanového a acetátového pufru. Fosforečnanový pufir byl tvořen  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  hydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou či  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  hydroxidem sodným. Acetátový pufir byl tvořen  $0,1 \text{ M}$  octovou kyselinou a  $0,1 \text{ M}$  octanem sodným, jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  hydroxidem sodným.

Uhlíková pasta byla připravena homogenizováním  $250 \text{ mg}$  mikrokuliček ze skelného uhlíku a  $100 \mu\text{l}$  minerálního oleje. Uhlíková pasta byla napěchována do těla elektrody – bylo použito teflonové tělo o vnitřním průměru  $2 \text{ mm}$  s nerezovým pístem.

## 2.4 Použité přístroje

### HPLC systém

- vysokotlaká pumpa Beta 10 (Ecom, Praha)
- dávkovací smyčka o objemu 20  $\mu$ l
- kolona: LiChroCART 125-4, RP – 18e (5  $\mu$ m)
- UV spektrofotometrický detektor Sapphire 800 (Ecom, Praha)
- amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha), který pracoval v tříelektrodovém zapojení s používanými elektrodami:
  - pracovní: uhlíková pastová elektroda a borem dopovaná diamantová filmová elektroda
  - referentní argentochloridová elektroda s 3 mol dm<sup>-3</sup> roztokem KCl
  - pomocná platinová elektroda
  - zapojení typu wall-jet
- programové vybavení: Clarity 2.3. (Data Apex, Praha)

### pH metr

- digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, UK)

### spektrofotometr

- Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometr (Nizozemí)

### elektrochemická aktivace elektrody

- přístroj Eco-Tribo Polarograph (PolaroSensors, Praha)

## 2.5 Použité vzorce

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{w_1 + w_2}$$

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

$R_{1,2}$  ..... rozlišení

$t_{r,1}, t_{r,2}, t_r$  .....retenční časy

$w_1, w_2$  ..... šířka píku při základně

$k$  ..... retenční faktor

$t_M$  ..... mrtvý čas

## 2.5 Pracovní postupy

### 2.5.1 Optimalizace separace

Separace analytů byla prováděna na neatermostatované koloně. K detekci byla použita UV detekce při vlnové délce 275 nm. Mrtvý čas kolony byl určen nástřikem vodného roztoku  $\text{KNO}_3$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Byly měřeny chromatogramy směsi těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  každé látky. Měření bylo provedeno se studovanými látkami rozpuštěnými v roztoku o stejném složení jako mobilní fáze, tj. směs acetonitrilu a acetátového pufru. Průtok mobilní fáze byl  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

### 2.5.2 Elektrochemická detekce

Amperometrický detektor byl sériově zapojen za UV spektrofotometrický detektor a pracoval v tříelektrodovém zapojení v uspořádání wall-jet. Všechny tři elektrody byly ponořeny v přepadové nádobce s mobilní fází. Vzdálenost pracovní elektrody od ústí kapiláry byla 1 mm.

Při optimalizaci elektrochemické detekce byly používány optimální podmínky separace, tedy mobilní fáze tvořená acetonitrem a acetátovým popř. fosforečnanovým pufrům o daném pH v poměru 50:50 (V/V).

Hydrodynamické voltamogramy daných látek při různých pH byly proměřeny pomocí nástřiku směsi těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Vložený potenciál byl +0,4 V až +1,4 V.

Opakovatelnost měření byla zjištěna pomocí nástřiku směsi studovaných látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v intervalu 2 minut. Bylo provedeno 10 nástřiků.

### 2.5.3 Aktivace povrchu BDDFE

Aktivace povrchu elektrody byla prováděna vsádkově. Do nádoby obsahující roztok 1 M kyseliny dusičné byly ponořeny všechny tři elektrody – pracovní borem dopovaná diamantová filmová elektroda, referentní argentochloridová elektroda a pomocná platinová elektroda. Na pracovní elektrodu byl vkládán potenciál +3,0 V a -3,0 V po dobu 20 s pro každý potenciál. Během aktivace byl roztok míchán.



#### 2.5.4 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly proměřeny pomocí UV spektrofotometrické i amperometrické detekce za optimálních podmínek separace. Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Z naměřených dat byly zjištěny meze detekce a meze stanovitelnosti.  $L_D$  a  $L_Q$  byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku, resp. desetinásobku absolutní hodnoty šumu.

#### 2.5.5 Stanovení studovaných látek v reálných vzorcích

Studované látky byly stanoveny v sušené mateřídoušce obecné, řebříčku obecném, dále v mateřídouškovém sirupu a v čajové směsi. Silice z rostlin byly získány macerací, tj. 0,5 g sušené rostliny bylo ponecháno spolu se 40 ml ethanolu louhovat 14 dní při pokojové teplotě.<sup>12</sup> Poté byl roztok přefiltrován. Extrakty z rostlin byly dávkovány přímo. Roztok sirupu byl připraven naředěním 0,5 ml sirupu do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50 (V/V). Příprava čaje: sáček byl přelit 200 ml vařící vody a louhován 10 minut. Roztok čaje byl připraven naředěním 1 ml čaje do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50 (V/V). Takto připravené roztoky byly přímo dávkovány na kolonu. Koncentrace studovaných látek v těchto reálných vzorcích byly stanoveny metodou standardního přídatku. Koncentrace studovaných látek v reálných vzorcích byly vypočítány metodou lineární extrapolace.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Vliv koncentrace acetonitrilu

Vzhledem k použití nové kolony musela být na základě výsledků z bakalářské práce<sup>39</sup> upřesněna vhodná koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

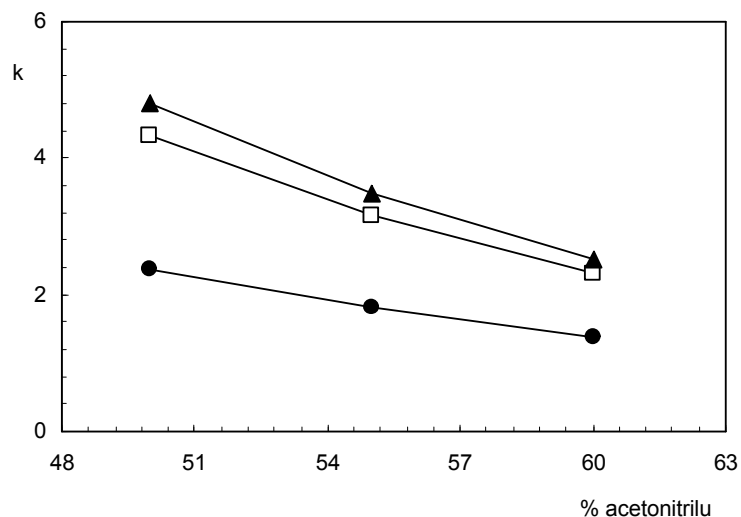
Měření bylo prováděno v mobilní fázi složené z acetonitrilu a acetátového pufru o pH 5 v poměru 60:40, 55:45, 50:50 (V/V).

Rozlišení píků stoupá se snižujícím se obsahem acetonitrilu, ale zároveň se prodlužuje doba analýzy. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze tvořená acetonitrem a acetátovým pufrem v poměru 50:50 (V/V), při níž rozlišení mezi karvakrolem a thymolem dosáhlo hodnoty 1,82. Chromatogram změřený za optimálních podmínek je znázorněný na obr. 3.2. Mrtvý čas kolony 0,934 min byl určen pomocí nástřiku vodného roztoku KNO<sub>3</sub> o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ .

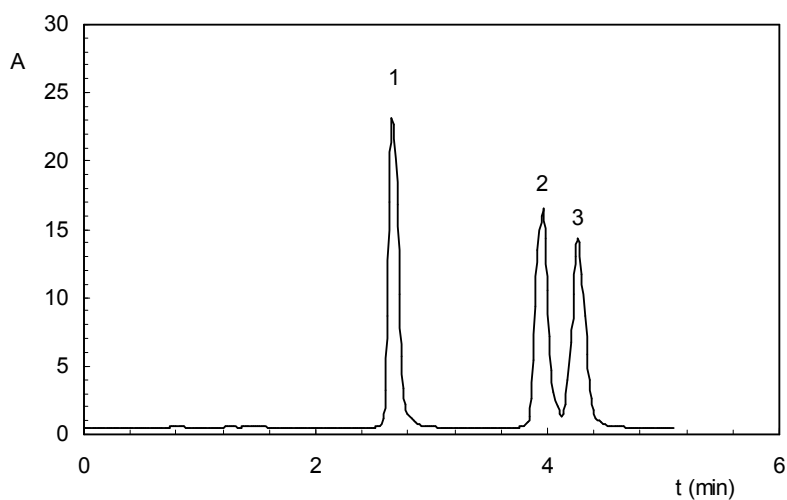
Získané retenční časy a retenční faktory pro studované látky jsou shrnuty v tab. 3.1. Grafické znázornění závislosti kapacitních faktorů studovaných látek na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi je uvedeno na obr. 3.1.

**Tab. 3.1** Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční charakteristiky eugenolu, karvakrolu a thymolu. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v příslušném poměru, průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm.

acetonitril : fosforečn. pufr (V/V)	eugenol		karvakrol		thymol	
	$t_r$ /min	$k$	$t_r$ /min	$k$	$t_r$ /min	$k$
60:40	1,29	1,39	2,16	2,31	2,35	2,52
55:45	1,69	1,82	2,94	3,15	3,24	3,47
50:50	2,22	2,38	4,04	4,32	4,49	4,81



**Obr. 3.1** Závislost retenčního faktoru  $k$  eugenolu (●), karvakrolu (□), a thymolu (▲) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v příslušném poměru, průtok 0,5 ml  $min^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.2** Chromatogram směsi eugenolu (1), karvakrolu (2) a thymolu (3) změřený za optimálního obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $min^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

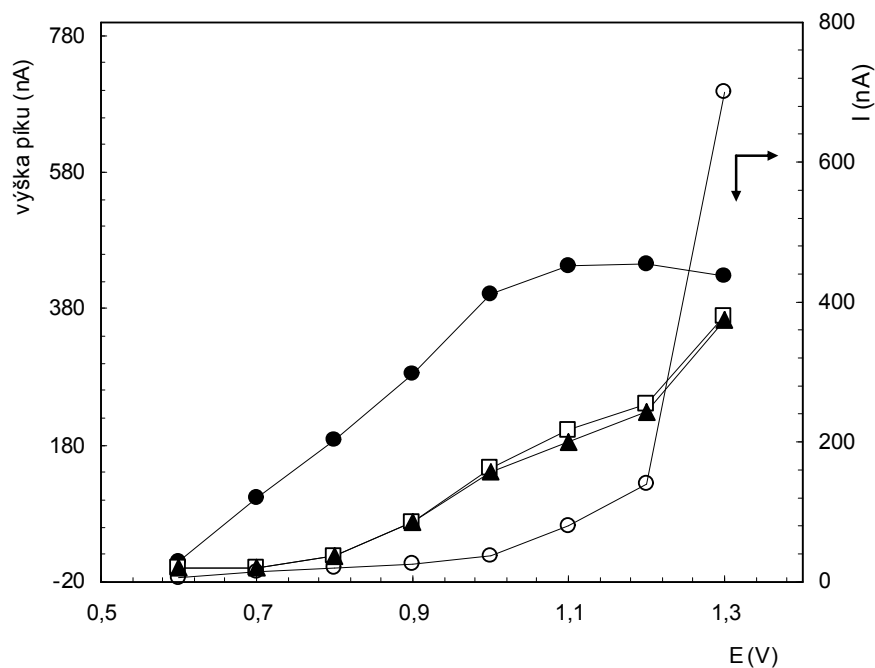
## 3.2 Uhlíková pastová elektroda

### 3.2.1 Optimalizace elektrochemické detekce na CPE

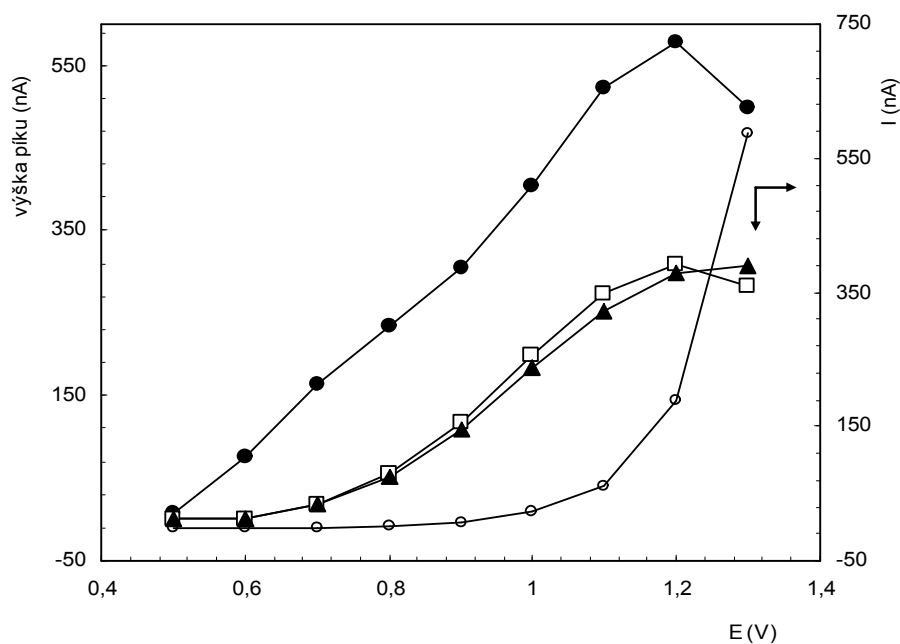
Optimální elektrochemické detekční podmínky byly získány na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, tedy závislosti výšky piku na potenciálu vkládaném na elektrodu. Hydrodynamické voltamogramy eugenolu, thymolu a karvakrolu byly měřeny při pH 3, 4, 5 a 7. Složení mobilní fáze bylo acetonitril a acetátový, popř. fosforečnanový pufr v poměru 50:50 (V/V).

Proměřovány byly hodnoty vkládaného potenciálu v rozmezí +0,4 V až +1,3 V. Dávkován byl roztok směsi eugenolu, karvakrolu a thymolu v acetonitrilu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ .

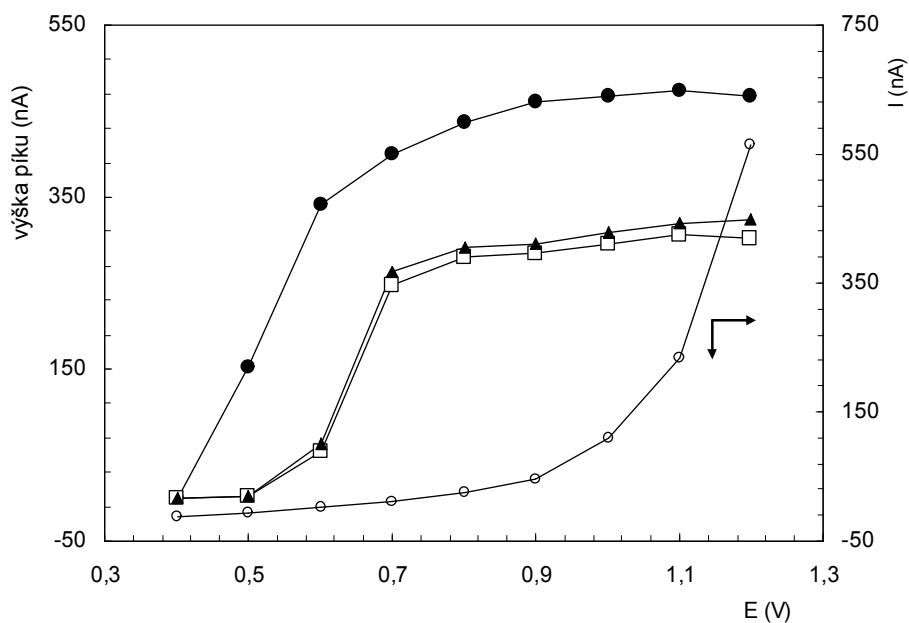
Získané hydrodynamické voltamogramy pro jednotlivé látky při různých pH jsou ukázány na obr. 3.3, 3.4, 3.5 a 3.6. Jako optimální pH bylo zvoleno pH 5 a jako optimální potenciál byl vyhodnocen potenciál +0,8 V, kde již všechny látky dosáhly maximální odezvy, ale ještě nedošlo ke zvýšení proudového pozadí.



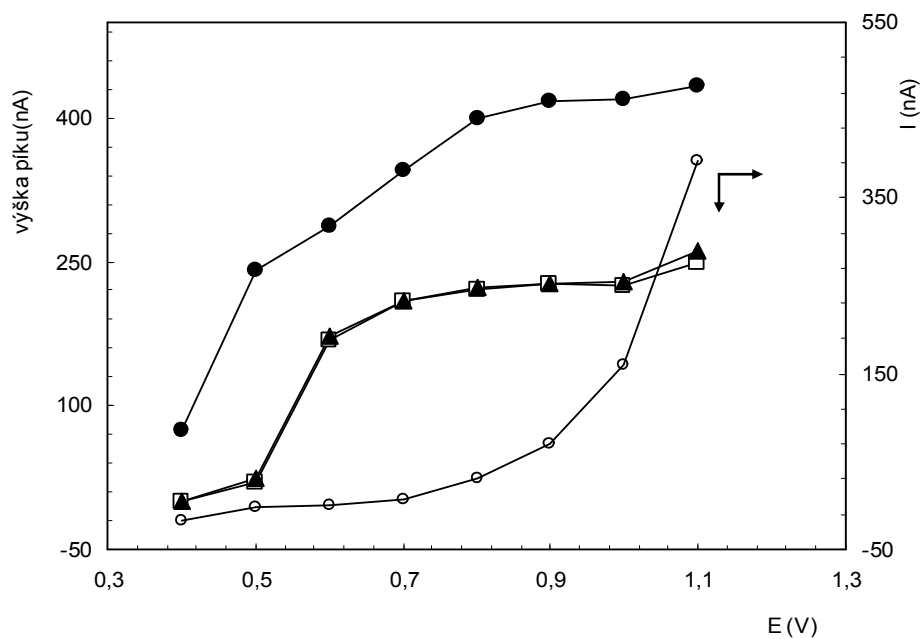
**Obr. 3.3** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 3. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 3 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min $^{-1}$ .



**Obr. 3.4** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 4. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 4 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.5** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 5. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.6** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 7. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 7 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

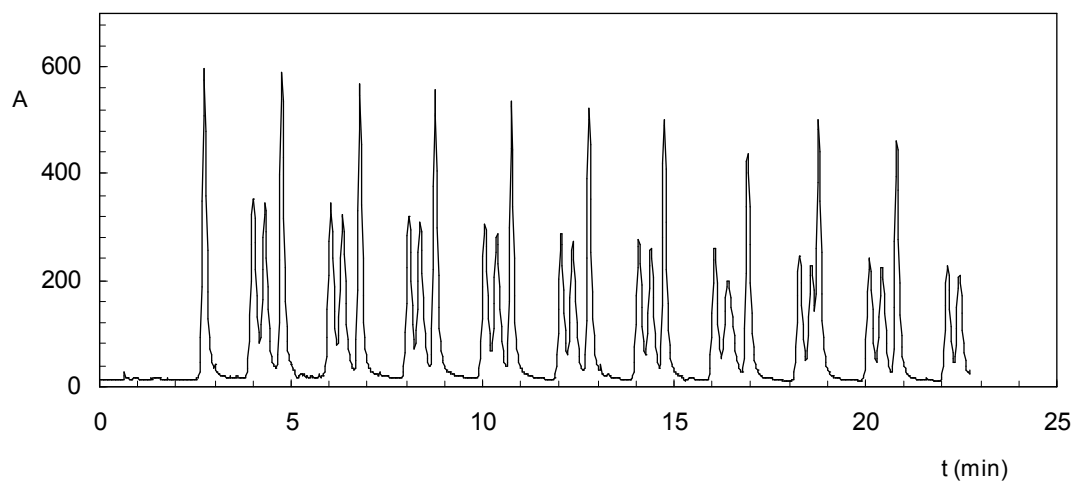
### 3.2.2 Opakovatelnost měření s CPE

Za optimálních podmínek měření byla zjištěna opakovatelnost měření s elektrochemickou detekcí. Nejprve bylo provedeno měření bez aktivace povrchu elektrody v průběhu měření. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi studovaných látek v acetonitrilu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v intervalu dvou minut. Poté bylo provedeno měření s obnovením povrchu elektrody po každém měření. Obnovení bylo prováděno otíráním povrchu elektrody. Výsledky jsou znázorněny v tab. 3.2 a záznam chromatogramu bez obnovení během měření je na obr. 3.7.

Z naměřených dat bylo zjištěno, že opakovatelnost měření je velmi špatná, výška píku studovaných látek klesla o 1/3 původní hodnoty, ale po obnovení povrchu se opakovatelnost výrazně zlepšila, proto bylo nutné povrch elektrody během měření obnovovat. Obnovení bylo prováděno po 3 analýzách.

**Tab. 3.2** Opakovatelnost měření elektrochemické detekce. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.

		eugenol	karvakrol	thymol
		výška píku (nA)	výška píku (nA)	výška píku (nA)
měření bez obnovení	průměr	484	246	226
	<i>s</i>	71	53	54
	<i>s<sub>r</sub></i> (%)	14,7	21,7	24,0
měření s obnovením	<i>průměr</i>	664	424	435
	<i>s</i>	20	19	21
	<i>s<sub>r</sub></i> (%)	2,9	4,7	4,8



**Obr. 3.7** Záznam chromatogramu opakovatelnosti měření s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4}$  mol l $^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min $^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.



### 3.2.3 Kalibrační závislost na CPE

Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +0,8 V. Za optimálních podmínek elektrochemické detekce byly proměřeny kalibrační závislosti v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  až  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ .

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí jednotlivých látek získané vyhodnocením z výšek píků naměřených chromatogramů jsou shrnuty v tab. 3.3, 3.4 a 3.5. Zjištěné meze stanovitelnosti  $L_Q$  a meze detekce  $L_D$  pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tab. 3.6. Absolutní hodnota šumu byla 0,640 nA. Kalibrační křivky vyhodnocené z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.8. Série chromatogramů směsi studovaných látek, kde je znázorněn pokles píku se snižující se koncentrací, je zobrazena na obr. 3.9.

Koncentrační závislosti jsou lineární v celém zkoumaném rozsahu, korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9058 až 0,9860. Korelační koeficienty jsou dost špatné, to může být způsobeno vysokým stupněm pasivace elektrody, který se nepodařilo úplně eliminovat. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u eugenolu, tj.  $4,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u karvakrolu, tj.  $7,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí (viz kapitola 3.4.1) jsou meze stanovitelnosti získané pomocí elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou přibližně o řád nižší.

**Tab. 3.3** Parametry kalibračních závislostí pro eugenol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +0,8 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

koncentrační rozsah, mol l <sup>-1</sup>	směrnice, nA l mol <sup>-1</sup>	úsek, nA	R
$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-5}$	$5,63 \cdot 10^6$	-39,46	0,9860
$1 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$	$4,23 \cdot 10^6$	4,16	0,9300
$1 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-7}$	$5,89 \cdot 10^6$	-0,93	0,9069

**Tab. 3.4** Parametry kalibračních závislostí pro karvakrol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +0,8 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

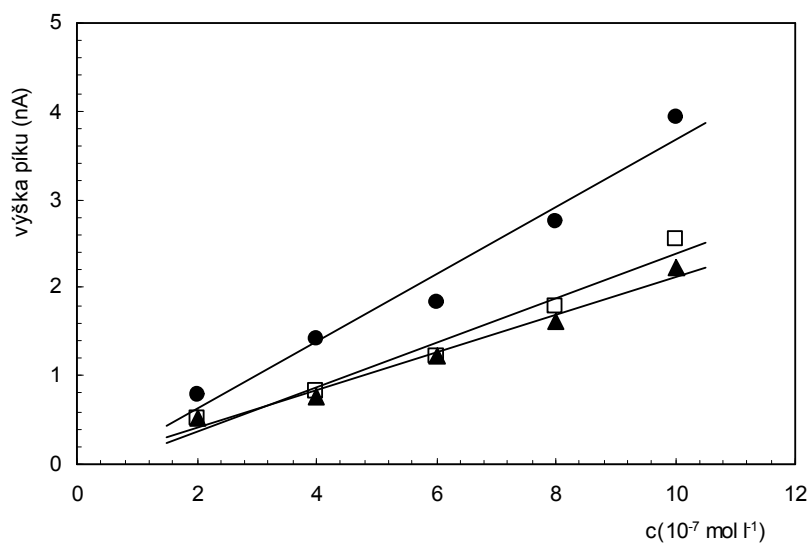
<b>koncentrační rozsah, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>směrnice, nA l mol<math>^{-1}</math></b>	<b>úsek, nA</b>	<b>R</b>
$1\cdot 10^{-4}$ - $2\cdot 10^{-5}$	$3,71\cdot 10^6$	-30,46	0,9833
$1\cdot 10^{-5}$ - $2\cdot 10^{-6}$	$2,75\cdot 10^6$	1,97	0,9356
$1\cdot 10^{-6}$ - $2\cdot 10^{-7}$	$2,52\cdot 10^6$	-0,13	0,9834

**Tab. 3.5** Parametry kalibračních závislostí pro thymol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +0,8 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

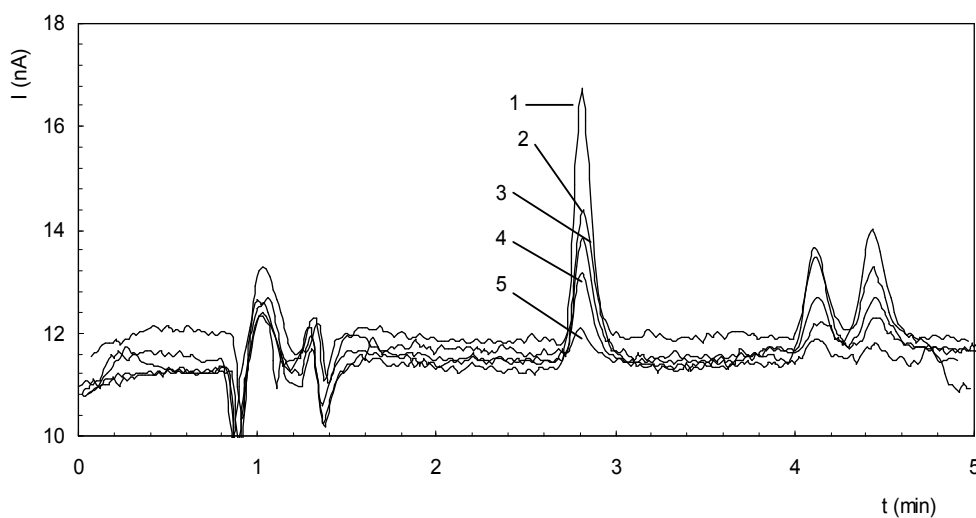
<b>koncentrační rozsah, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>směrnice, nA l mol<math>^{-1}</math></b>	<b>úsek, nA</b>	<b>R</b>
$1\cdot 10^{-4}$ - $2\cdot 10^{-5}$	$3,50\cdot 10^6$	-30,20	0,9861
$1\cdot 10^{-5}$ - $2\cdot 10^{-6}$	$2,43\cdot 10^6$	2,24	0,9280
$1\cdot 10^{-6}$ - $2\cdot 10^{-7}$	$2,52\cdot 10^6$	-0,16	0,9849

**Tab. 3.6** Meze stanovitelnosti eugenolu, karvakrolu a thymolu zjištěné ze stanovení těchto látek pomocí HPLC elektrochemickou detekcí při potenciálu +0,8 V. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

<b>Analyt</b>	<b>mez stanovitelnosti <math>L_D</math>, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>mez detekce <math>L_D</math>, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>
eugenol	$4,60\cdot 10^{-7}$	$1,38\cdot 10^{-7}$
karvakrol	$7,10\cdot 10^{-7}$	$2,13\cdot 10^{-7}$
thymol	$6,60\cdot 10^{-7}$	$1,98\cdot 10^{-7}$



**Obr. 3.8** Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e ( $5 \mu\text{m}$ ), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi o  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , elektrochemická detekce při potenciálu  $+0,8 \text{ V}$ .



**Obr. 3.9** Série chromatogramů směsi o koncentracích (v  $\text{mol l}^{-1}$ )  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $8 \cdot 10^{-7}$  (2),  $6 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $2 \cdot 10^{-7}$  (5). Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e ( $5 \mu\text{m}$ ), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , elektrochemická detekce při potenciálu  $+0,8 \text{ V}$ .

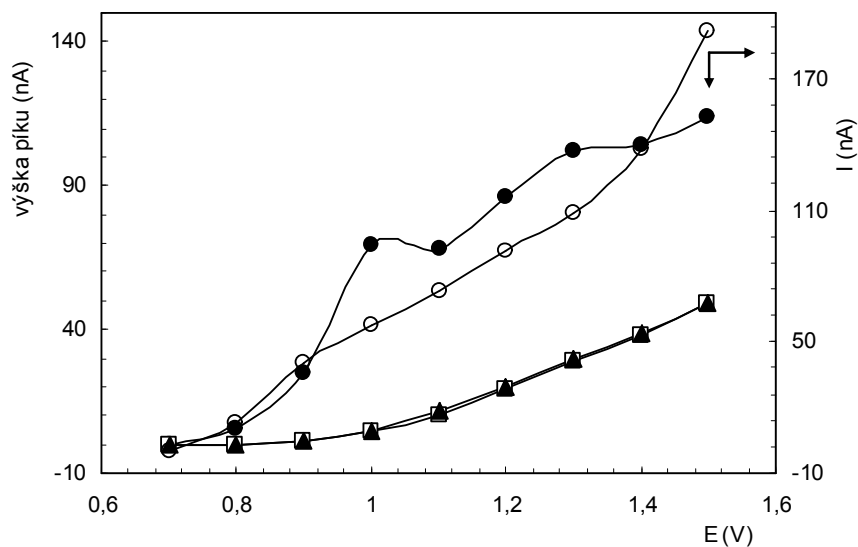
### 3.3 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

#### 3.3.1 Optimalizace elektrochemické detekce na BDDFE

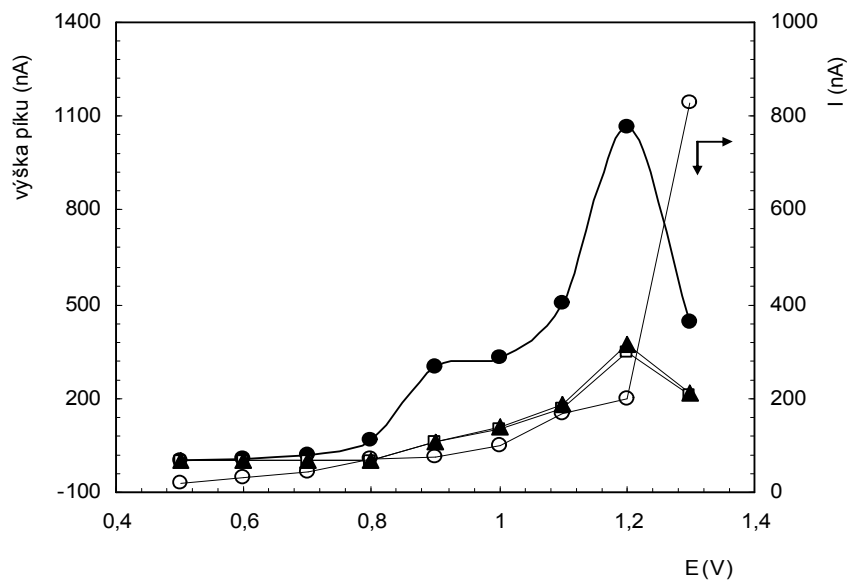
Optimální elektrochemické detekční podmínky byly získány na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, tedy závislosti výšky píku na potenciálu vkládaném na elektrodu. Hydrodynamické voltamogramy eugenolu, thymolu a karvakrolu byly měřeny při pH 3, 5 a 7. Složení mobilní fáze bylo acetonitril a acetátový, popř. fosforečnanový pufr v poměru 50:50 (V/V).

Proměřovány byly hodnoty vkládaného potenciálu v rozmezí +0,5 V až +1,5 V. Dávkován byl roztok směsi eugenolu, karvakrolu a thymolu v acetonitrilu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ .

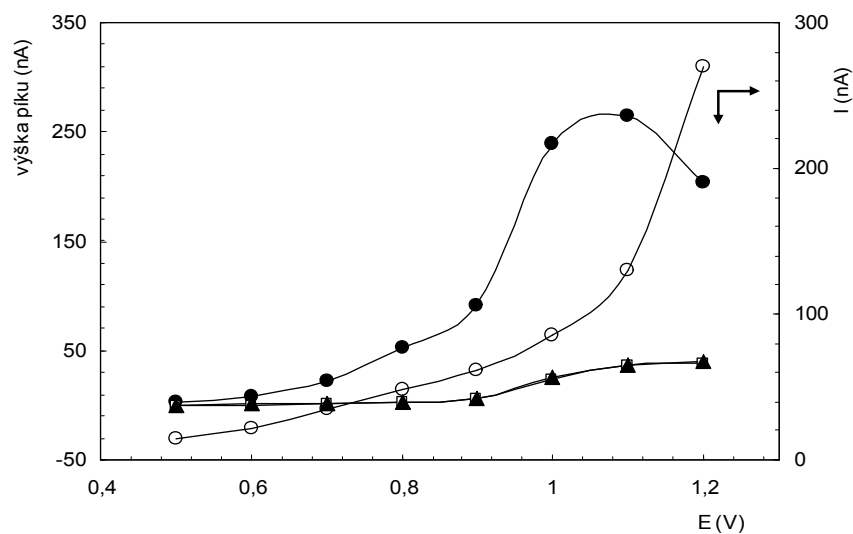
Získané hydrodynamické voltamogramy pro jednotlivé látky při různých pH jsou ukázány na obr. 3.10, 3.11 a 3.12. Jako optimální pH bylo zvoleno pH 5, stejně jako u elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou, a jako optimální potenciál byl vyhodnocen potenciál +1,2 V, kde již všechny látky dosáhly maximální odezvy, ale ještě nedošlo ke zvýšení proudového pozadí. Potenciál je oproti uhlíkové pastové elektrodě vyšší, což je ve shodě s obecnou tendencí BDDFE k nižší reverzibilitě elektrochemických reakcí a tedy posunu jejich potenciálů k vyšším hodnotám.



**Obr. 3.10** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 3. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 3 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .



**Obr. 3.11** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 5. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .



**Obr. 3.12** Hydrodynamické voltamogramy eugenolu (●), karvakrolu (□), thymolu (▲) a proud pozadí (○) při pH 7. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 7 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Opakovatelnost měření s BDDFE

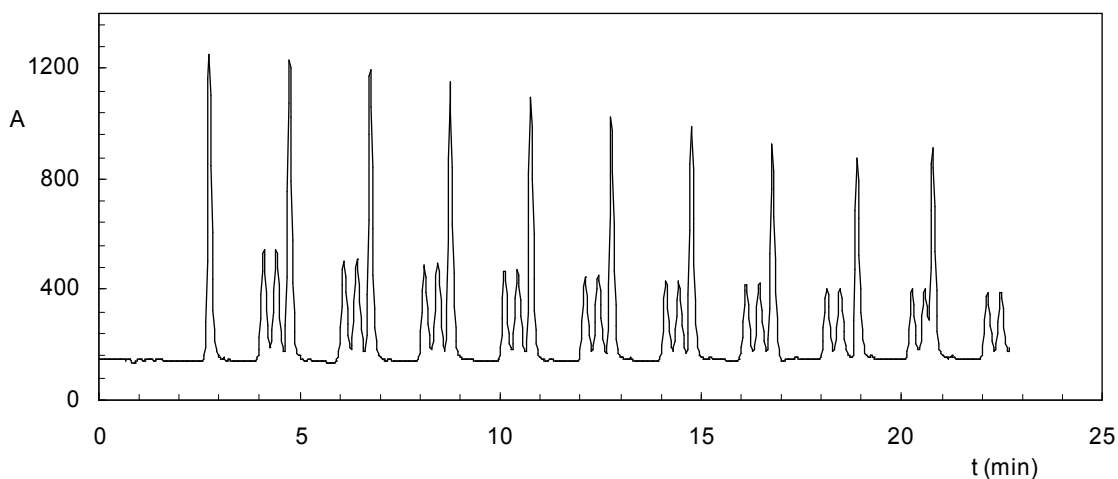
Za optimálních podmínek měření byla zjištěna opakovatelnost měření elektrochemické detekce. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi studovaných látek v acetonitrilu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v intervalu dvou minut. Pro ověření správné aktivace povrchu BDDFE byla ještě naměřena opakovatelnost měření s aktivací povrchu elektrody během měření. Výsledky jsou znázorněny v tab. 3.7 a záznam chromatogramu bez aktivace povrchu elektrody v průběhu měření je na obr. 3.13.

Aktivace povrchu elektrody byla prováděna vsádkově. Do nádoby obsahující roztok 1 M kyseliny dusičné, byly ponořeny všechny tři elektrody – pracovní borem dopovaná diamantová filmová elektroda, referentní argentochloridová elektroda a pomocná platinová elektroda. Na pracovní elektrodu byl vkládán potenciál +3,0 V a -3,0 V po dobu 20 s pro každý potenciál. Během aktivace byl roztok míchán.

Z naměřených výsledků je patrné, že opakovatelnost měření s BDDFE bez aktivace je velmi špatná, výška píku klesla během měření o 30 %, po aktivaci se opakovatelnost měření zlepšila, a proto bylo nutné aktivaci povrchu BDDFE provádět již po 3 analýzách.

**Tab. 3.7** Opakovatelnost měření elektrochemické detekce. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , vložený potenciál na BDDFE +1,2 V.

		eugenol	karvakrol	thymol
		výška píku (nA)	výška píku (nA)	výška píku (nA)
měření bez aktivace	průměr	937	309	311
	<i>s</i>	128	50	51
	<i>s<sub>r</sub></i> (%)	13,7	16,2	16,3
měření s aktivací	<i>průměr</i>	1070	431	430
	<i>s</i>	76	41	38
	<i>s<sub>r</sub></i> (%)	7,1	9,5	8,9



**Obr. 3.13** Záznam chromatogramu opakovatelnosti měření s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $min^{-1}$ , vložený potenciál na BDDFE +1,2 V.



### 3.3.3 Kalibrační závislost na BDDFE

Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu pracovní borem dopované diamantové filmové elektrody +1,2 V. Proměřeny byly kalibrační závislosti v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  až  $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ .

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí jednotlivých látek získané vyhodnocením z výšek píků z naměřených chromatogramů jsou shrnuty v tab. 3.8, 3.9 a 3.10. Zjištěné meze stanovitelnosti  $L_Q$  a meze detekce  $L_D$  pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tab. 3.11. Absolutní hodnota šumu byla 0,662 nA. Kalibrační křivky vyhodnocené z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.14. Série chromatogramů směsi studovaných látek, kde je znázorněn pokles píku se snižující se koncentrací je zobrazena na obr. 3.15.

Koncentrační závislosti jsou lineární v celém zkoumaném rozsahu, korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9061 až 0,9911. Korelační koeficienty jsou dost špatné, to může být způsobeno vysokým stupněm pasivace elektrody, který se nepodařilo úplně eliminovat. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u eugenolu, tj.  $1,97 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ , naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u karvakrolu, tj.  $3,19 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ . Meze stanovitelnosti získané elektrochemickou detekcí s borem dopovanou diamantovou elektrodou jsou srovnatelné se spektrofotometrickou detekcí (viz kapitola 3.4.1), ve srovnání s elektrochemickou detekcí s uhlíkovou pastovou elektrodou (viz kapitola 3.2.3) jsou přibližně o řád vyšší.

**Tab. 3.8** Parametry kalibračních závislostí pro eugenol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,2 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

<b>koncentrační rozsah, mol l<sup>-1</sup></b>	<b>směrnice, nA l mol<sup>-1</sup></b>	<b>úsek, nA</b>	<b>R</b>
$1 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-5}$	$1,08 \cdot 10^7$	-123,75	0,9545
$1 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$	$1,94 \cdot 10^7$	-40,18	0,9394
$1 \cdot 10^{-6}$ - $6 \cdot 10^{-7}$	$1,47 \cdot 10^7$	-5,81	0,9911

**Tab. 3.9** Parametry kalibračních závislostí pro karvakrol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,2 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

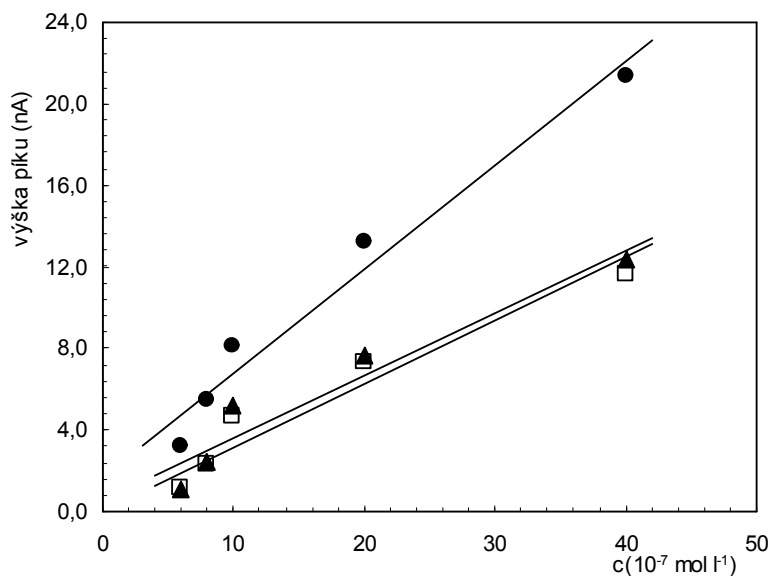
<b>koncentrační rozsah, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>směrnice, nA l mol<math>^{-1}</math></b>	<b>úsek, nA</b>	<b>R</b>
$1\cdot 10^{-4}$ - $2\cdot 10^{-5}$	$3,94\cdot 10^6$	-51,67	0,9319
$1\cdot 10^{-5}$ - $2\cdot 10^{-6}$	$6,71\cdot 10^6$	-13,59	0,9082
$1\cdot 10^{-6}$ - $6\cdot 10^{-7}$	$8,82\cdot 10^6$	-4,33	0,9857

**Tab. 3.10** Parametry kalibračních závislostí pro thymol stanovené HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,2 V vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

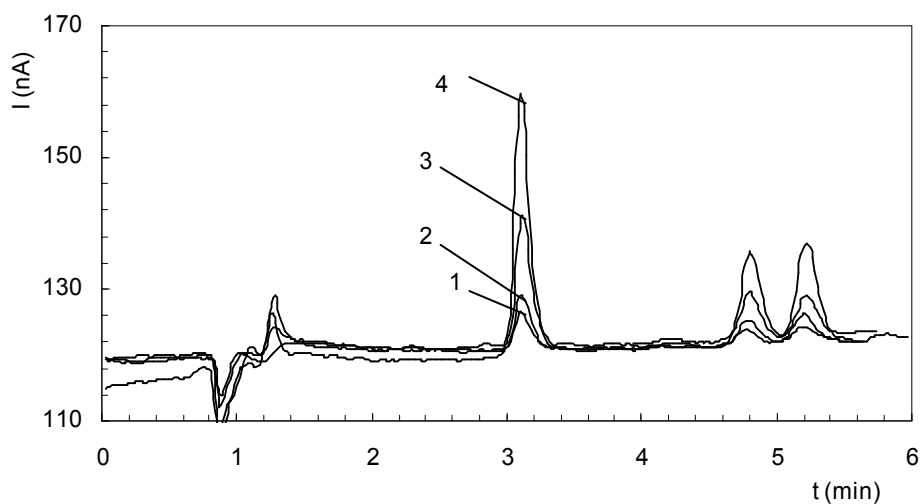
<b>koncentrační rozsah, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>směrnice, nA l mol<math>^{-1}</math></b>	<b>úsek, nA</b>	<b>R</b>
$1\cdot 10^{-4}$ - $2\cdot 10^{-5}$	$3,92\cdot 10^6$	-51,26	0,9301
$1\cdot 10^{-5}$ - $2\cdot 10^{-6}$	$6,98\cdot 10^6$	-14,38	0,9061
$1\cdot 10^{-6}$ - $6\cdot 10^{-7}$	$1,03\cdot 10^7$	-5,35	0,9822

**Tab. 3.11** Meze stanovitelnosti a meze detekce eugenolu, karvakrolu a thymolu zjištěné ze stanovení těchto látek pomocí HPLC elektrochemickou detekcí při potenciálu +1,2 V. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1\cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

<b>Analyt</b>	<b>mez stanovitelnosti <math>L_Q</math>, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>	<b>mez detekce <math>L_D</math>, mol <math>\Gamma^{-1}</math></b>
eugenol	$1,97\cdot 10^{-6}$	$5,91\cdot 10^{-7}$
karvakrol	$3,19\cdot 10^{-6}$	$9,58\cdot 10^{-7}$
thymol	$2,95\cdot 10^{-6}$	$8,86\cdot 10^{-7}$



**Obr. 3.14** Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $4 \cdot 10^{-6}$  až  $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , elektrochemická detekce při potenciálu BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.15** Série chromatogramů eugenolu, karvakrolu a thymolu o koncentracích (v  $\text{mol l}^{-1}$ )  $6 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $1 \cdot 10^{-6}$  (4). Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , elektrochemická detekce při potenciálu BDDFE +1,2 V.

### 3.4 Spektrofotometrická detekce

#### 3.4.1 Kalibrační závislost

Spektrofotometrická detekce byla měřena při 275 nm. Byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných látek v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  až  $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ .

Změřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí jednotlivých látek získané vyhodnocením z výšek píků z naměřených chromatogramů jsou shrnuty v tab. 3.12, 3.13 a 3.14. Dosažené meze stanovitelnosti  $L_Q$  a meze detekce  $L_D$  jsou uvedeny v tab. 3.15. Absolutní hodnota šumu byla 0,120 mAU. Kalibrační křivky vyhodnocené z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.16. Série chromatogramů směsi studovaných látek, kde je znázorněn pokles píků se snižující se koncentrací je zobrazena na obr. 3.17.

Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9975 až 0,9999. Nejnížší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u eugenolu tj.  $2,82 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ , naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u thymolu tj.  $3,28 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ .

**Tab.3.12** Parametry kalibračních závislostí pro eugenol stanovené HPLC se spektrofotometrickou detekcí vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm.

<b>koncentrační rozsah, mol l<sup>-1</sup></b>	<b>směrnice, mAU l mol<sup>-1</sup></b>	<b>úsek, mAU</b>	<b>R</b>
$1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-5}$	$2,46 \cdot 10^5$	-0,10	0,9999
$8 \cdot 10^{-6}$ - $8 \cdot 10^{-7}$	$2,18 \cdot 10^5$	0,01	0,9975

**Tab.3.13** Parametry kalibračních závislostí pro karvakrol stanovené HPLC se spektrofotometrickou detekcí vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

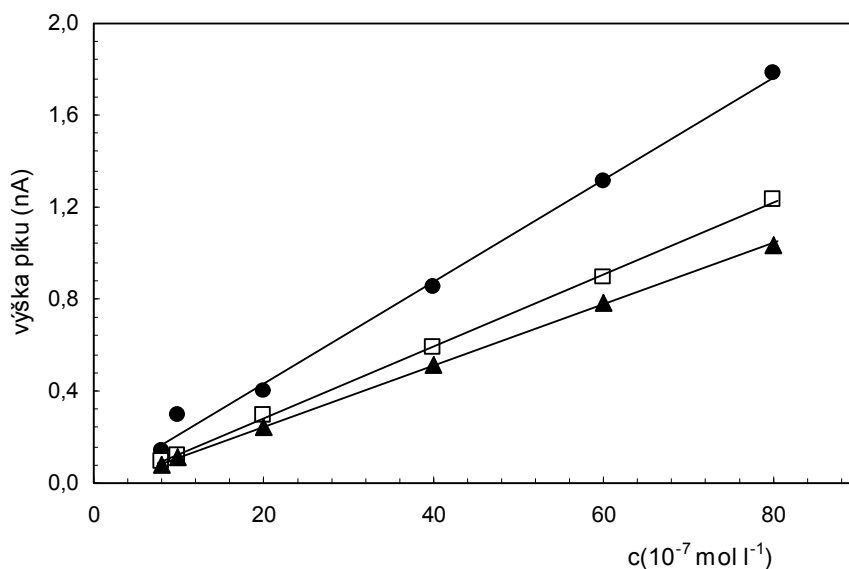
<b>koncentrační rozsah, <math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>směrnice, <math>\text{mAU l mol}^{-1}</math></b>	<b>úsek, <math>\text{mAU}</math></b>	<b><i>R</i></b>
$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,72 \cdot 10^5$	0,05	0,9984
$8 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-7}$	$1,56 \cdot 10^5$	-0,02	0,9997

**Tab.3.14** Parametry kalibračních závislostí pro thymol stanovené HPLC se spektrofotometrickou detekcí vyhodnocené z výšek píků. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

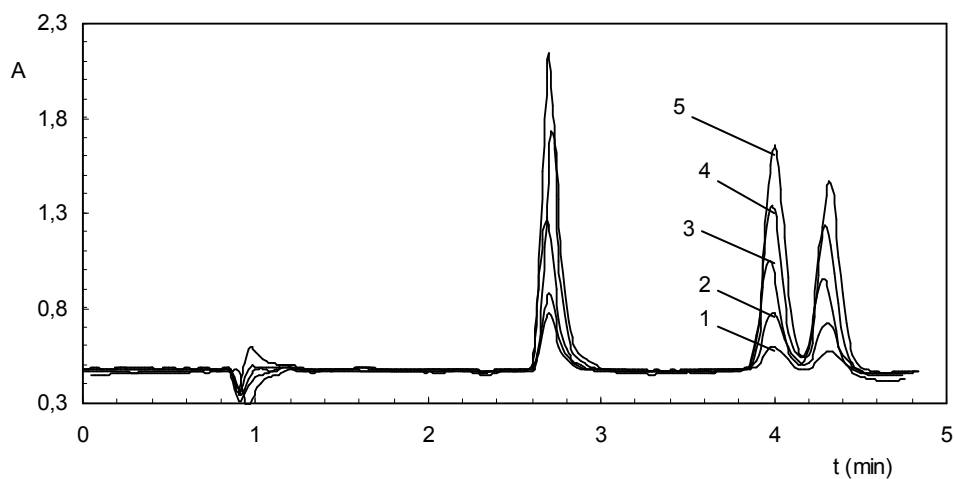
<b>koncentrační rozsah, <math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>směrnice, <math>\text{mAU l mol}^{-1}</math></b>	<b>úsek, <math>\text{mAU}</math></b>	<b><i>R</i></b>
$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,47 \cdot 10^5$	0,05	0,9997
$8 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-7}$	$1,33 \cdot 10^5$	-0,02	0,9999

**Tab. 3.15** Meze stanovitelnosti eugenolu, karvakrolu a thymolu zjištěné ze stanovení těchto látek pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5μm), dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o  $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

<b>Anlyt</b>	<b>mez stanovitelnosti <math>L_Q</math>, <math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>mez detekce <math>L_D</math>, <math>\text{mol l}^{-1}</math></b>
eugenol	$2,82 \cdot 10^{-6}$	$8,45 \cdot 10^{-7}$
karvakrol	$3,13 \cdot 10^{-6}$	$9,38 \cdot 10^{-7}$
thymol	$3,28 \cdot 10^{-6}$	$9,84 \cdot 10^{-7}$



**Obr. 3.16** Kalibrační křivky eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $8 \cdot 10^{-6}$  až  $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.17** Série chromatogramů eugenolu, karvakrolu a thymolu o koncentracích (v mol l<sup>-1</sup>)  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5), Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku směsi v mobilní fázi, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm.

### 3.5 Stanovení studovaných látek v reálných vzorcích

#### 3.5.1 Stanovení v Mateřídoušce obecné

Ke stanovení byla použita sušená nať mateřídoušky obecné. Extrakt, obsahující studované látky byl získán macerací, jak je popsáno v kapitole 2.5.6. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  tohoto extraktu. Stanovení koncentrace studovaných látek bylo provedeno metodou standardního přídávku roztoku těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Přídavek byl proveden do roztoku extraktu a činil 100  $\mu\text{l}$ . Byly provedeny dva standardní přídávky. Koncentrace studovaných látek v extraktu byla vypočítána metodou lineární extrapolace.

Chromatogramy extraktu z mateřídoušky bez přídávku, s prvním a druhým přídávkem pro všechny tři způsoby detekce jsou znázorněny na obr. 3.18, 3.20 a 3.22. Kalibrační závislosti stanovení studovaných látek v extraktu z mateřídoušky pro všechny tři způsoby detekce jsou uvedeny na obr. 3.19, 3.21 a 3.23. Vypočtené směrnice přímek z ploch i výšek pro všechny tři způsoby detekce jsou uvedeny v tab. 3.16 a zjištěné koncentrace jsou shrnuty v tab. 3.17. V mateřídoušce obecné byly všechny tři studované látky stanoveny pouze pomocí elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou. Pomocí spektrofotometrické detekce byl detekován karvakrol a eugenol a stanoven thymol. Pomocí elektrochemické detekce s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou byl detekován pouze thymol, proto se tato elektroda oproti uhlíkové pastové elektrodě jeví jako nevhodná pro stanovení studovaných látek.

**Tab. 3.16** Stanovení studovaných látek v extraktu z mateřídoušky metodou standardního přídávku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

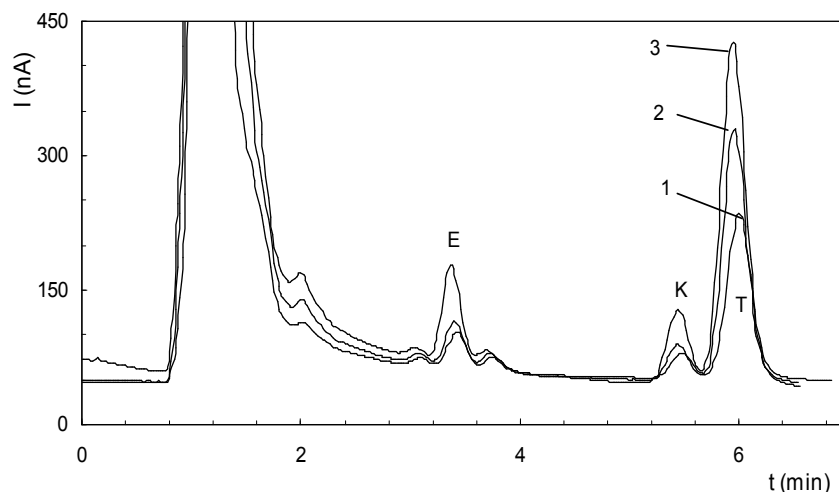
analyt	směrnice			směrnice		
	UV	ED s CPE	ED	UV	ED s CPE	ED
	mAU s l mg <sup>-1</sup>	nA s l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA s l mg <sup>-1</sup>	mAU l mg <sup>-1</sup>	nA l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA l mg <sup>-1</sup>
eugenol	89,1	2311	6157	8,2	203,4	498,4
karvakrol	65,2	2684	5616	4,6	183,4	407,8
thymol	179,9	10869	9426	11,6	656,2	576,1

**Tab. 3.17** Stanovení studovaných látek v extraktu z mateřídoušky metodou standardního přídávku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na BDDFE +1,2 V a na CPE +0,8 V, UV detekce při 275 nm.

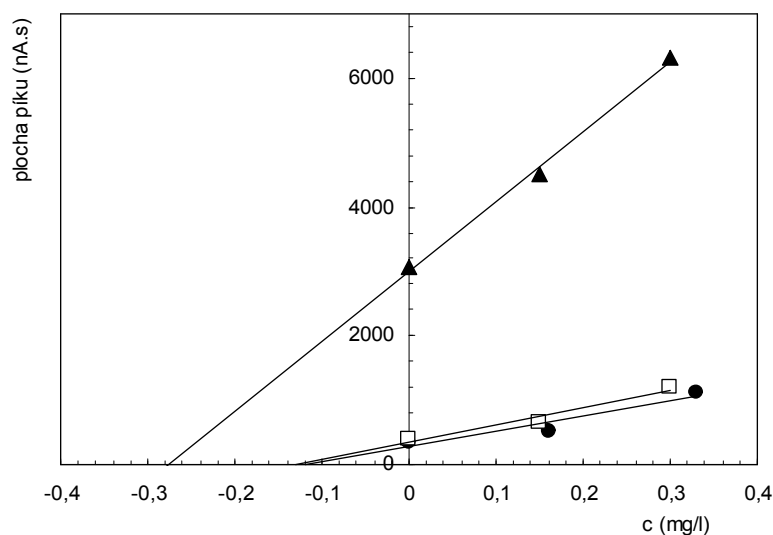
analyt	Zjištěné koncentrace (mg l <sup>-1</sup> )		
	UV detekce	ED s CPE	ED s BDDFE
eugenol	+	0,12	–
karvakrol	+	0,13	–
thymol	0,80	0,30	+

+ nad mezí detekce, ale pod mezí stanovitelnosti; – pod mezí detekce

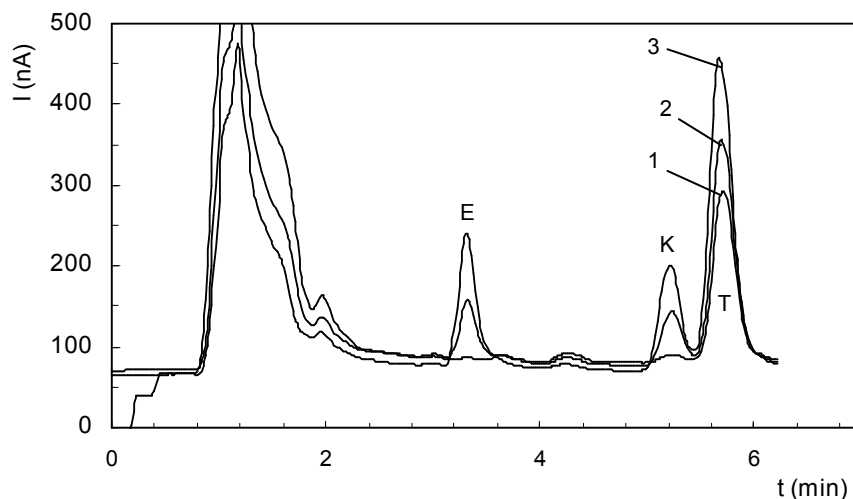




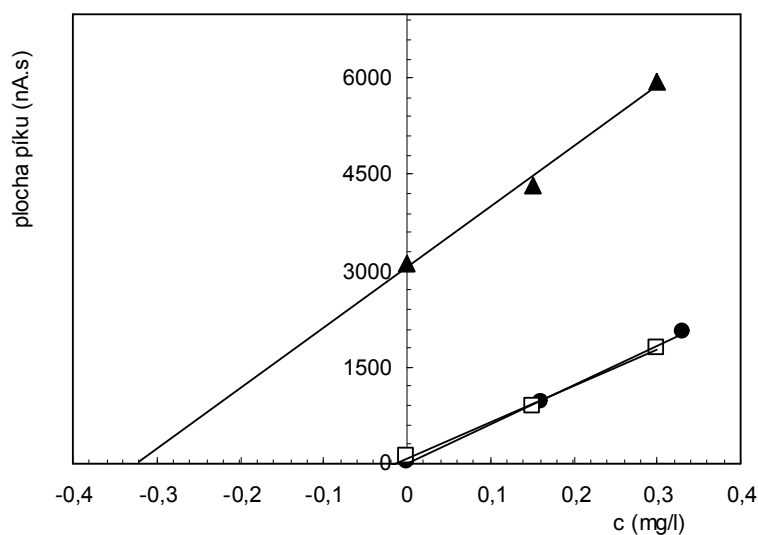
**Obr. 3.18** Chromatogram extraktu z mateřídoušky bez přídavku (1), vzorek+přídavek 100 µl (2) a vzorek+přídavek 200 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V.



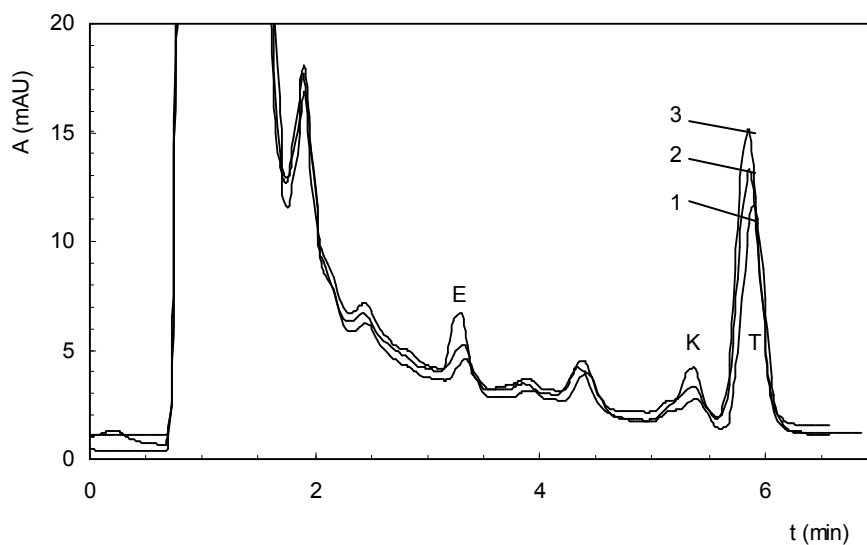
**Obr. 3.19** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z mateřídoušky metodou standardního přídavku. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V.



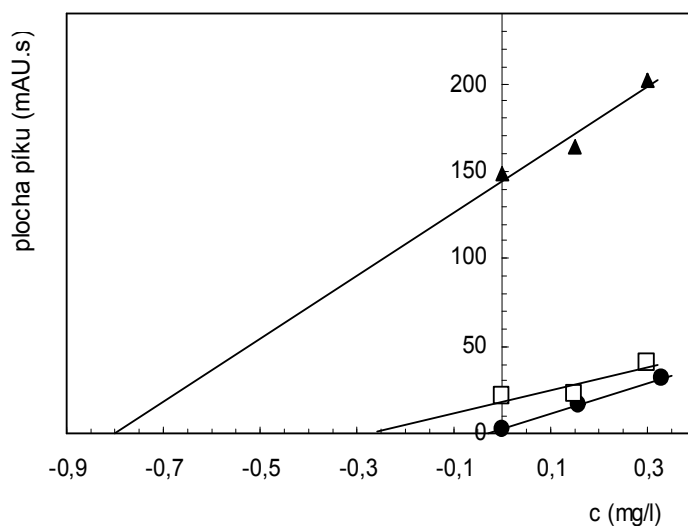
**Obr. 3.20** Chromatogram extraktu z mateřídoušky bez přídavku (1), vzorek+přídavek 100 µl (2) a vzorek+přídavek 200 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.21** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z mateřídoušky metodou standardního přídavku. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.22** Chromatogram extraktu z mateřídoušky bez přídavku (1), vzorek+přídavek 100 µl (2) a vzorek+přídavek 200 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.23** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z mateřídoušky metodou standardního přídavku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

### 3.5.2 Stanovení v Řebříčku obecném

Ke stanovení byla použita sušená nat' řebříčku obecného. Extrakt, obsahující studované látky byl získán macerací, jak je popsáno v kapitole 2.5.6. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  tohoto extraktu. Stanovení koncentrace studovaných látek bylo provedeno metodou standardního přídávku pomocí roztoku těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Přídavek byl proveden do roztoku extraktu a činil 10  $\mu\text{l}$ . Byly provedeny dva standardní přídavky. Koncentrace studovaných látek v extraktu byla vypočítána metodou lineární extrapolace.

Chromatogramy extraktu z řebříčku bez přídávku, s prvním a druhým přídávkem pro všechny tři způsoby detekce jsou znázorněny na obr. 3.24, 3.26 a 3.28. Kalibrační závislosti stanovení studovaných látek v extraktu z mateřidoušky pro všechny způsoby detekce jsou uvedeny na obr. 3.25, 3.27 a 3.29. Vypočtené směrnice z ploch i výšek pro všechny tři způsoby detekce jsou uvedeny v tab. 3.18 a zjištěné koncentrace jsou shrnuty v tab. 3.19. V řebříčku obecném byl detekován pouze karvakrol pomocí spektrofotometrické detekce. Koncentrace eugenolu a thymolu se pohybovaly pod mezí stanovitelnosti i pod mezí detekce.

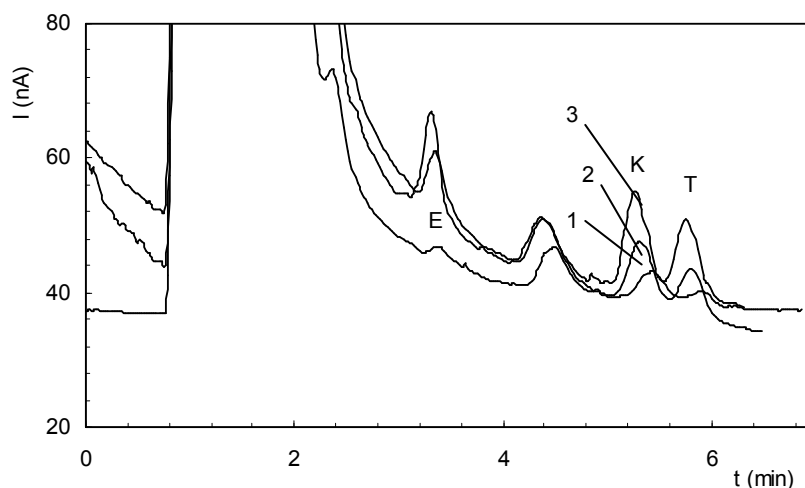
**Tab. 3.18** Stanovení studovaných látek v extraktu z řebříčku metodou standardního přídávku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	směrnice			směrnice		
	UV	ED s CPE	ED	UV	ED s CPE	ED
	mAU s l mg <sup>-1</sup>	nA s l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA s l mg <sup>-1</sup>	mAU l mg <sup>-1</sup>	nA l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA l mg <sup>-1</sup>
eugenol	55,8	4627	4432	9,5	407,5	377,2
karvakrol	97,5	4433	5347	0,84	331,4	349,3
thymol	145,2	5117	5519	10,5	314,2	340,7

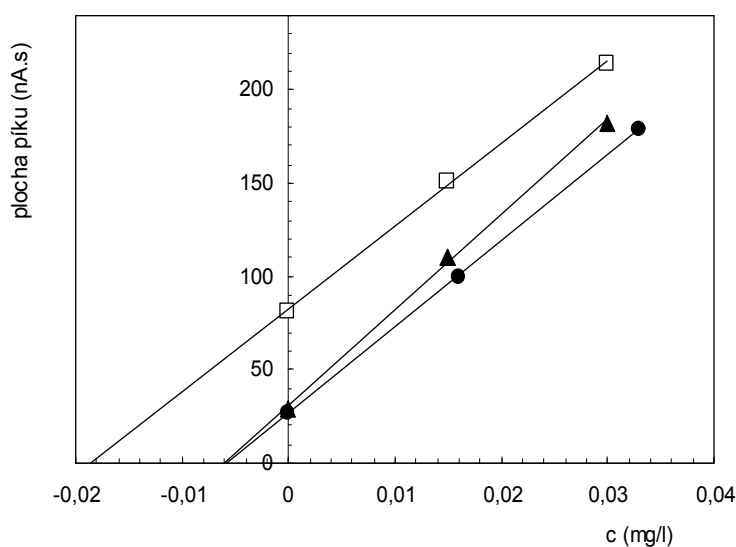
**Tab. 3.19** Stanovení studovaných látek v extraktu z řebříčku metodou standardního přídatku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5μm), dávkováno 20 μl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	Zjištěné koncentrace (mg l <sup>-1</sup> )		
	UV detekce	ED s CPE	ED s BDDFE
eugenol	–	–	–
karvakrol	+	–	–
thymol	–	–	–

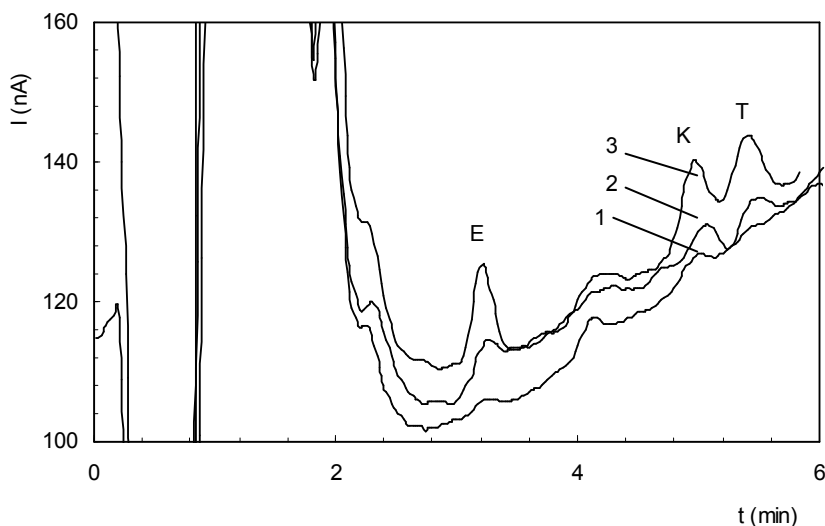
+ nad mezí detekce, ale pod mezí stanovitelnosti; – pod mezí detekce



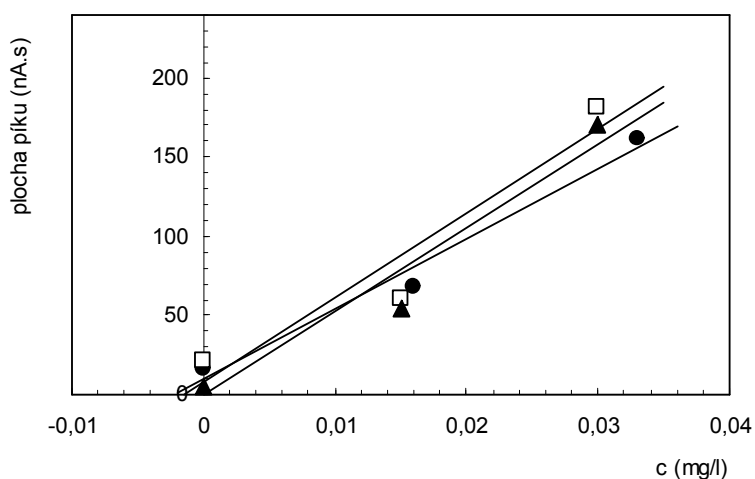
**Obr. 3.24** Chromatogram extraktu z řebříčku bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10 µl (2) a vzorek+přídavek 20 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.



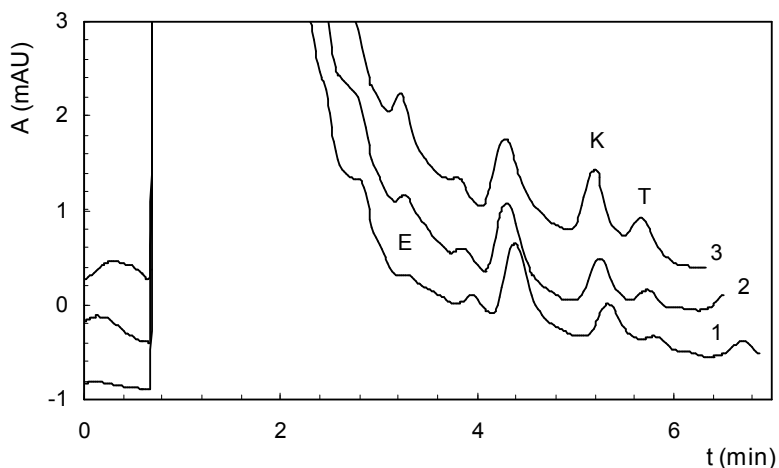
**Obr. 3.25** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z řebříčku metodou standardního přídavku. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.



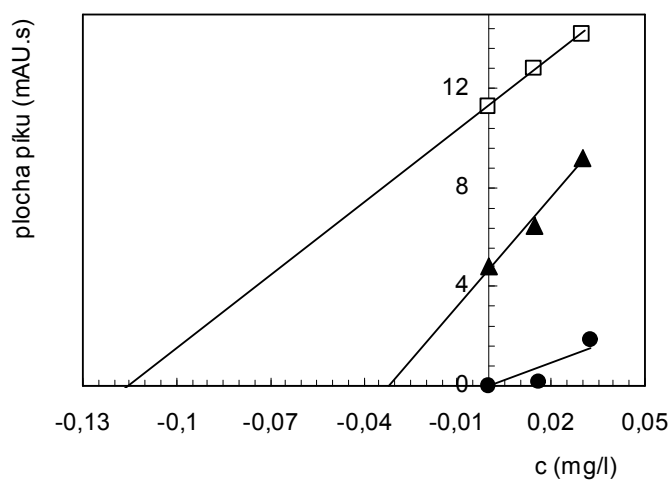
**Obr. 3.26** Chromatogram extraktu z řebříčku bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10  $\mu\text{l}$  (2) a vzorek+přídavek 20  $\mu\text{l}$  (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.27** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z řebříčku metodou standardního přídavku. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.28** Chromatogram extraktu z řebříčku bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10 µl (2) a vzorek+přídavek 20 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.29** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v extraktu z řebříčku metodou standardního přídavku. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl extraktu, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



### 3.5.3 Stanovení v průduškové léčivé čajové směsi Pulmoran

Ke stanovení byl použit průduškový čaj Pulmoran v nálevových sáčkích. Sáček byl přelit šálkem vařící vody a louhován 10 minut, poté byl tento roztok naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50 (V/V). Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku. Stanovení koncentrace studovaných látek bylo provedeno metodou standardního přídatku. Ten byl proveden pomocí roztoku studovaných látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Přídavek byl proveden do roztoku čaje a činil 20  $\mu\text{l}$  nebo 10  $\mu\text{l}$  v případě elektrochemické detekce s BDDFE. Byly provedeny dva standardní přídatky. Koncentrace studovaných látek v extraktu byla vypočítána metodou lineární extrapolace.

Chromatogramy průduškového čaje bez přídatku, s prvním a druhým přídatkem pro všechny tři způsoby detekce jsou znázorněny na obr. 3.30, 3.32 a 3.34. Kalibrační závislosti stanovení studovaných látek v průduškovém čaji pro všechny způsoby detekce jsou uvedeny na obr. 3.31, 3.33 a 3.35. Vypočtené směrnice přímek z ploch i výšek pro všechny tři způsoby detekce jsou uvedeny v tab. 3.20 a zjištěné koncentrace jsou shrnuty v tab. 3.21. V průduškovém čaji byl detekován karvakrol a stanoven thymol, a to pomocí elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou. Thymol byl dále detekován pomocí spektrofotometrické detekce a elektrochemické detekce s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou. Eugenol nebyl v průduškovém čaji přítomen.

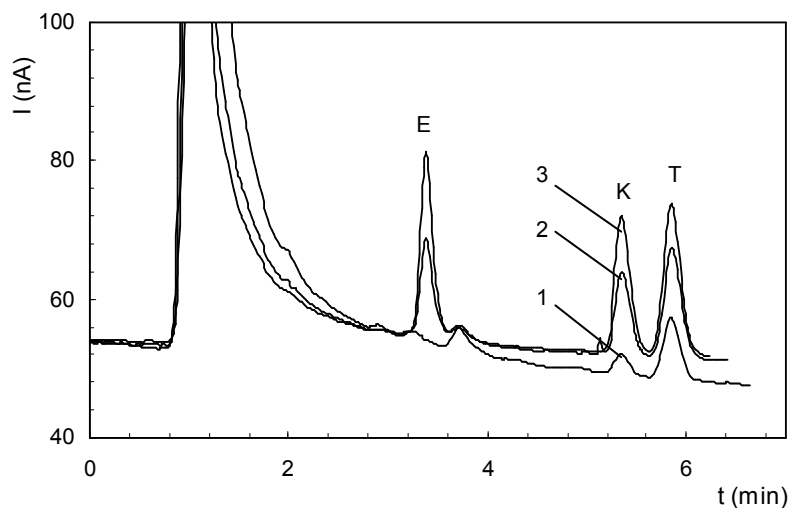
**Tab. 3.21** Stanovení studovaných látek v průduškovém čaji metodou standardního přídatku. Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	směrnice			směrnice		
	UV	ED s CPE	ED	UV	ED s CPE	ED
	mAU s l mg <sup>-1</sup>	nA s l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA s l mg <sup>-1</sup>	mAU l mg <sup>-1</sup>	nA l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA l mg <sup>-1</sup>
eugenol	91,1	3413	6797	13,2	403,6	567,6
karvakrol	123,2	3273	3445	12,2	292,9	238,7
thymol	135,2	2855	4236	12,5	253,9	263,3

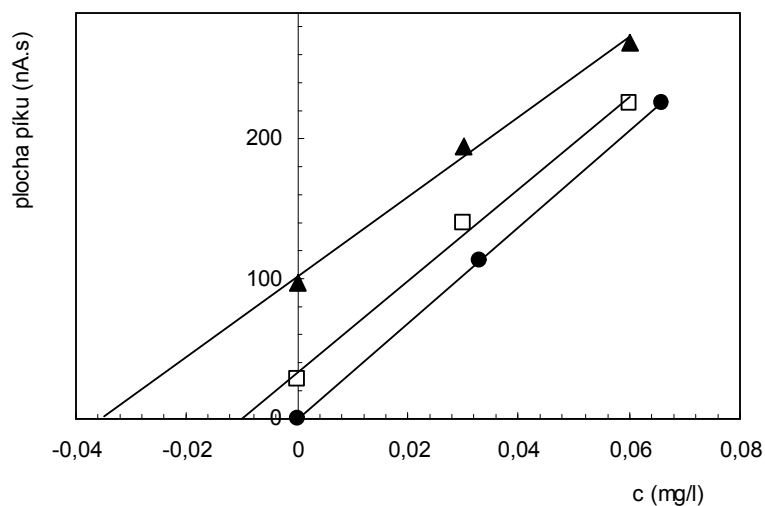
**Tab. 3.22** Stanovení studovaných látek v průduškovém čaji metodou standardního přídatku. Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na BDDFE +1,2 V a na CPE +0,8 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	Zjištěné koncentrace (mg l <sup>-1</sup> )		
	UV detekce	ED s CPE	ED s BDDFE
eugenol	–	–	–
karvakrol	–	+	–
thymol	+	0,35	+

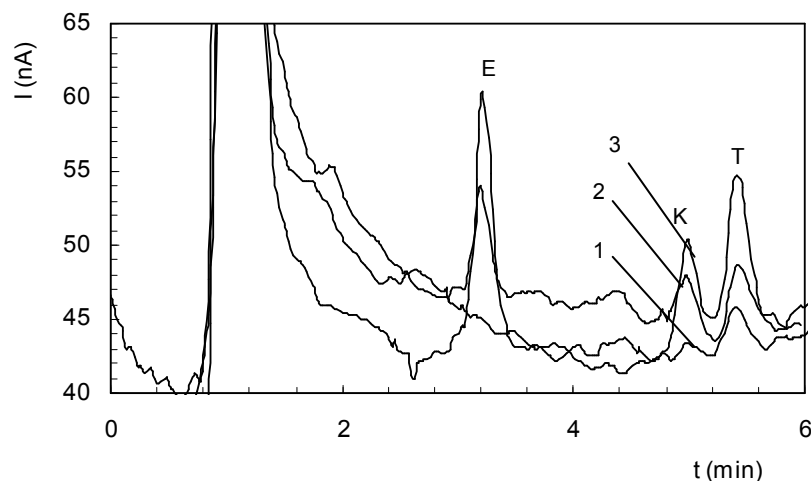
+ nad mezí detekce, ale pod mezí stanovitelnosti; – pod mezí detekce



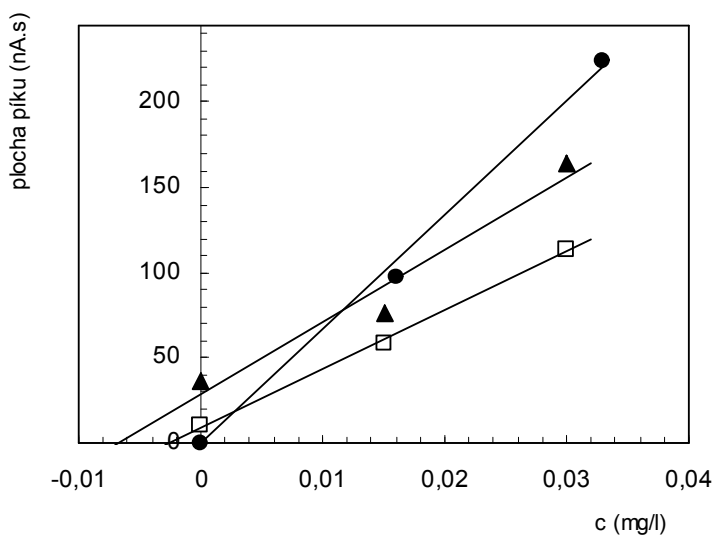
**Obr. 3.30** Chromatogram průduškového čaje bez přídavku (1), vzorek+přídavek 20 µl (2) a vzorek+přídavek 40 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.



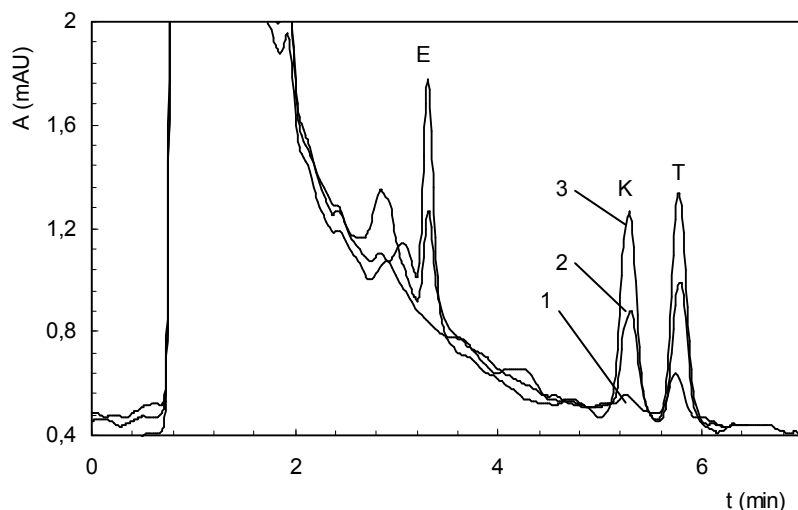
**Obr. 3.31** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v průduškovém čaji metodou standardního přídavku. Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.



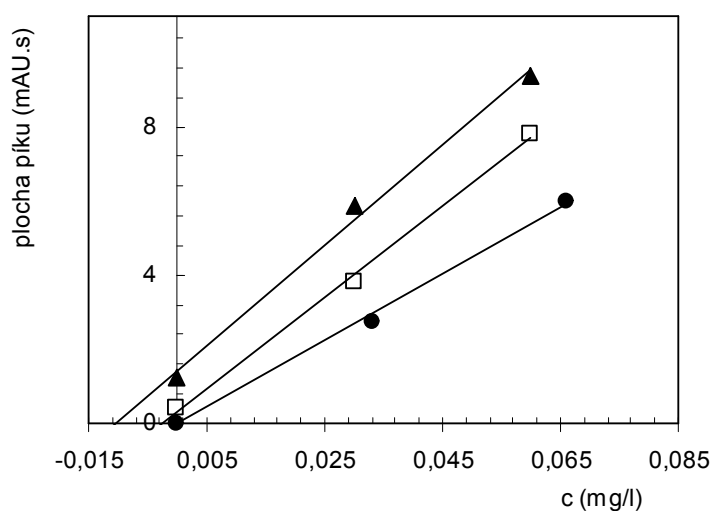
**Obr. 3.32** Chromatogram průduškového čaje bez přídavku (1), vzorek+přídavek 20 µl (2) a vzorek+přídavek 40 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.33** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v průduškovém čaji metodou standardního přídavku. Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.34** Chromatogram průduškového čaje bez přídavku (1), vzorek+přídavek 20  $\mu\text{l}$  (2) a vzorek+přídavek 40  $\mu\text{l}$  (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.35** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v průduškovém čaji. Čaj byl naředěn 1:9 acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.

### 3.5.4 Stanovení v sirupu s jitrocelem a mateřídouškou

Ke stanovení byl použit Vincentka sirup s jitrocelem a mateřídouškou. Vzorek k měření byl připraven naředěním 0,5 ml sirupu do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50 (V/V). Dávkováno bylo 20  $\mu$ l tohoto roztoku. Stanovení koncentrace studovaných látek bylo provedeno metodou standardního přídatku pomocí roztoku těchto látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonitrilu. Přídatek byl proveden do roztoku sirupu a činil 10  $\mu$ l. Byly provedeny dva standardní přídatky. Koncentrace studovaných látek v extraktu byla vypočítána metodou lineární extrapolace.

Chromatogramy sirupu s mateřídouškou bez přídatku, s prvním a druhým přídatkem pro všechny tři způsoby detekce jsou znázorněny na obr. 3.36, 3.38 a 3.40. Kalibrační závislosti stanovení studovaných látek v sirupu s mateřídouškou pro všechny způsoby detekce jsou uvedeny na obr. 3.37, 3.39 a 3.41. Vypočtené směrnice přímk z ploch i výšek pro všechny tři způsoby detekce jsou uvedeny v tab. 3.22 a zjištěné koncentrace jsou shrnuty v tab. 3.23. V sirupu s mateřídouškou byly pomocí elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou detekovány všechny tři studované látky, ale stanoven byl pouze thymol. Koncentrace karvakrolu a eugenolu se pohybovaly pod mezí stanovitelnosti. Thymol byl ještě detekován pomocí elektrochemické detekce s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou.

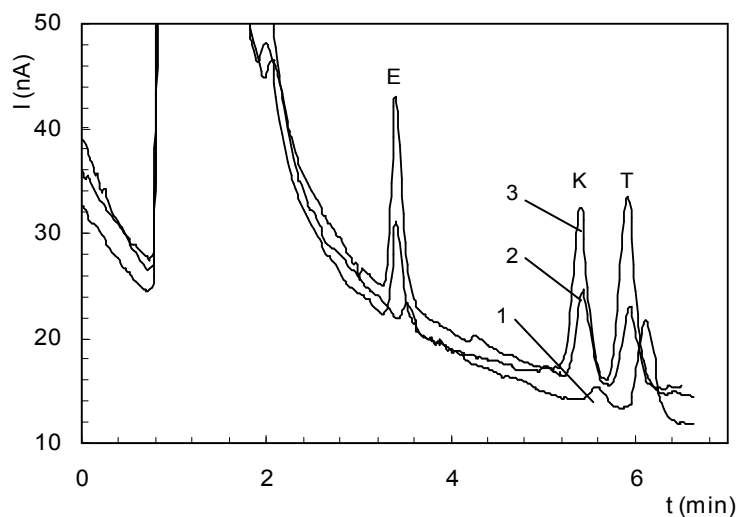
**Tab. 3.22** Stanovení studovaných látek v sirupu s mateřídouškou metodou standardního přídatku. 0,5 ml sirupu naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	směrnice			směrnice		
	UV	ED s CPE	ED	UV	ED s CPE	ED
	mAU s l mg <sup>-1</sup>	nA s l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA s l mg <sup>-1</sup>	mAU l mg <sup>-1</sup>	nA l mg <sup>-1</sup>	s BDDFE nA l mg <sup>-1</sup>
eugenol	89,7	4647	5295	12,4	516,3	403,8
karvakrol	97,9	5337	4237	9,5	475,9	263,5
thymol	129,5	3978	3428	14,7	275,1	165,7

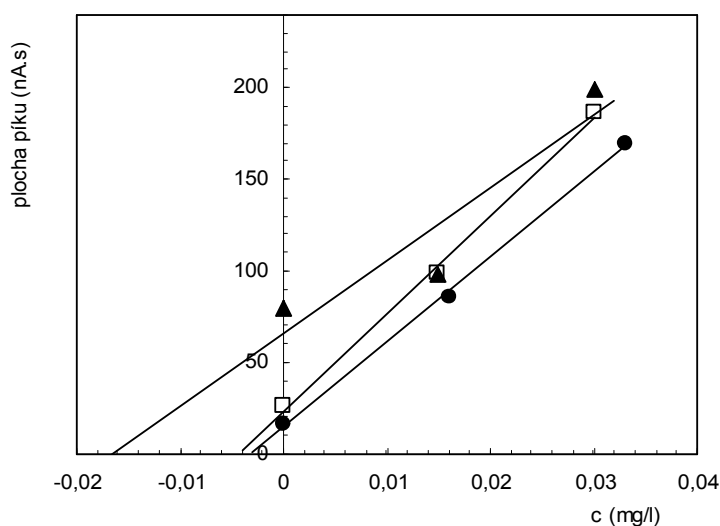
**Tab. 3.23** Stanovení studovaných látek v sirupu s mateřídouškou metodou standardního přídatku. 0,5 ml sirupu naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, vložený potenciál na CPE +0,8 V a na BDDFE +1,2 V, UV detekce při 275 nm.

analyt	Zjištěné koncentrace (mg l <sup>-1</sup> )		
	UV detekce	ED s CPE	ED s BDDFE
eugenol	–	+	–
karvakrol	–	+	–
thymol	–	0,34	+

+ nad mezí detekce, ale pod mezí stanovitelnosti; – pod mezí detekce

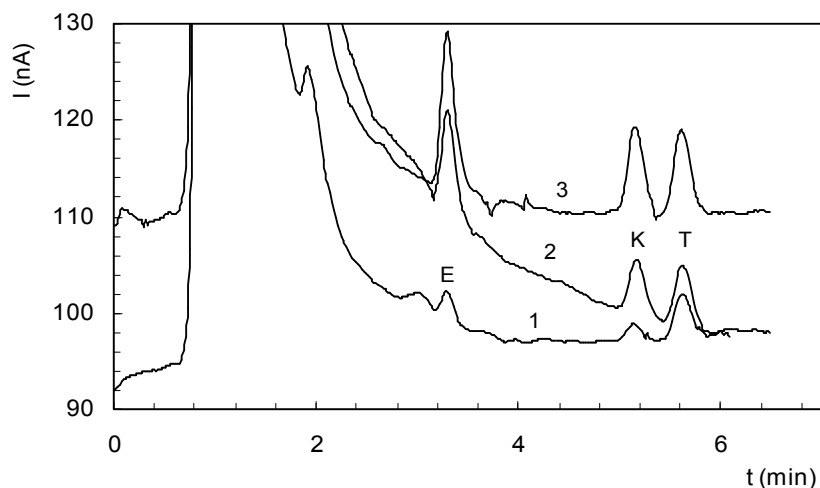


**Obr. 3.36** Chromatogram sirupu s mateřídouškou bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10 µl (2) a vzorek+přídavek 20 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.

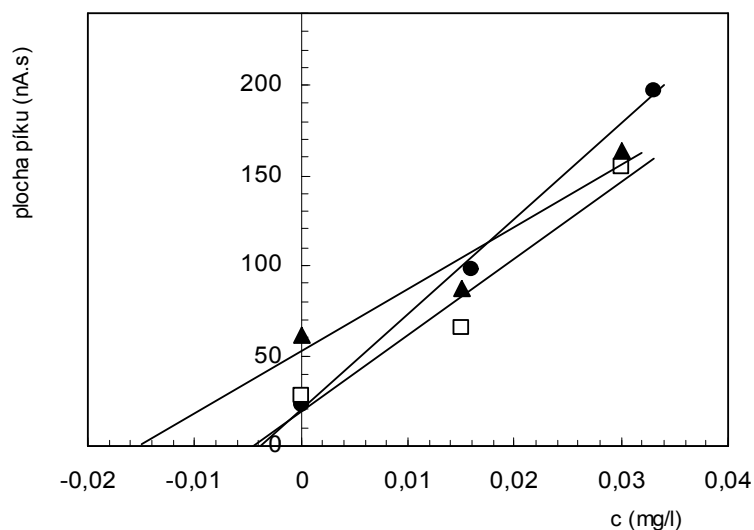


**Obr. 3.37** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v sirupu s mateřídouškou. 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s CPE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na CPE +0,8 V.

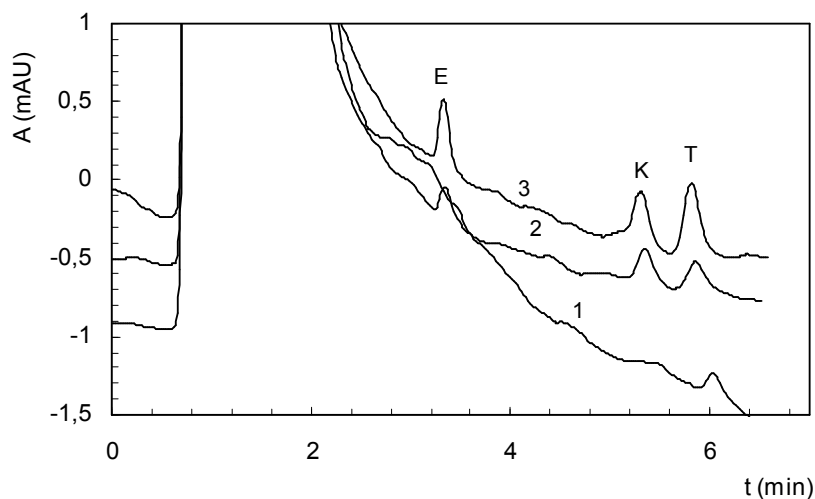




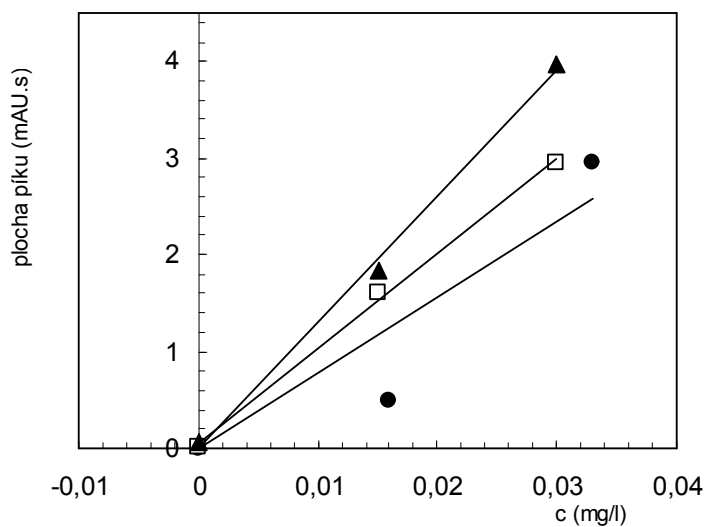
**Obr. 3.38** Chromatogram sirupu s mateřídouškou bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10 µl (2) a vzorek+přídavek 20 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.39** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v sirupu s mateřídouškou metodou standardního přídavku. 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Elektrochemická detekce s BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , potenciál na BDDFE +1,2 V.



**Obr. 3.40** Chromatogram sirupu s mateřídouškou bez přídavku (1), vzorek+přídavek 10 µl (2) a vzorek+přídavek 20 µl (3) roztoku eugenolu (E), thymolu (T) a karvakrolu (K) o  $c=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm.



**Obr. 3.41** Stanovení eugenolu (●), karvakrolu (□) a thymolu (▲) v sirupu s mateřídouškou metodou standardního přídavku. 0,5 ml sirupu bylo naředěno do 10 ml acetonitrilem s vodou v poměru 50:50. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), průtok  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce při 275 nm

## 4. Závěr

Bylo prostudováno chromatografické chování eugenolu, karvakrolu a thymolu. Byly proměřeny retenční charakteristiky studovaných látek v závislosti na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

Byly nalezeny optimální podmínky HPLC separace směsi studovaných látek s použitím spektrofotometrické detekce: mobilní fáze tvořená acetonitrem a acetátovým pufrům v poměru 50:50 (V/V), detekce probíhala při 275 nm. Za těchto podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti.

Při elektrochemické detekci byly jako pracovní elektrody použity uhlíková pastová elektroda a borem dopovaná diamantová elektroda. Byla prostudována závislost jejich odezvy na pH a na vloženém potenciálu. Měření probíhalo za optimálních podmínek separace. Jako optimální pH bylo zvoleno pH 5. Jako optimální potenciál byl u uhlíkové pastové elektrody zvolen potenciál +0,8 V a u borem dopované diamantové elektrody byl zvolen potenciál +1,2 V. Za těchto podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny meze stanovitelnosti. Zjištěné meze stanovitelnosti jednotlivých látek pro všechny způsoby detekce jsou shrnuty v tab. 4.1

Studované látky byly stanoveny v reálných vzorcích pomocí spektrofotometrické detekce při vlnové délce 275 nm a elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou a borem dopovanou diamantovou elektrodou. Reálné vzorky byly mateřídouška obecná, řebříček obecný, průdušková léčivá čajová směs a sirup s jitrocelem a mateřídouškou. Stanovení probíhalo za optimálních podmínek separace a optimálních podmínek elektrochemické detekce. Zjištěné koncentrace v reálných vzorcích pro jednotlivé látky jsou shrnuty v tab. 4.2, 4.3 a 4.4. Hledané látky se podařilo stanovit pouze ve vzorcích s jejich dostatečným obsahem. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou. Borem dopovaná diamantová filmová elektroda není vhodná pro stanovení studovaných látek.

**Tab. 4.1** Přehled dosažených mezí stanovitelnosti eugenolu, karvakrolu a thymolu spektrofotometrické a elektrochemické detekce s CPE a BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm, ED při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +0,8 V a ED při potenciálu borem dopované diamantové elektrody +1,2 V.

mezí stanovitelnosti $L_Q$ (mol l <sup>-1</sup> )			
analyt	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce s CPE	elektrochemická detekce s BDDFE
eugenol	$2,82 \cdot 10^{-6}$	$4,60 \cdot 10^{-7}$	$1,97 \cdot 10^{-6}$
karvakrol	$3,13 \cdot 10^{-6}$	$7,10 \cdot 10^{-7}$	$3,19 \cdot 10^{-6}$
thymol	$3,28 \cdot 10^{-6}$	$6,60 \cdot 10^{-7}$	$2,95 \cdot 10^{-6}$

**Tab. 4.2** Přehled zjištěných koncentrací eugenolu v reálných vzorcích stanovených pomocí spektrofotometrické detekce, elektrochemické detekce s CPE a BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5 $\mu$ m), dávkováno 20  $\mu$ l vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm, ED při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +0,8 V a ED při potenciálu borem dopované diamantové filmové elektrody +1,2 V.

hmotnostní koncentrace $c_g$ (mg l <sup>-1</sup> )			
analyt	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce s CPE	elektrochemická detekce s BDDFE
mateřídouška			
obecná	+	0,12	—
řebříček obecný	—	—	—
Vincentka sirup	—	+	—
Pulmoran-			
průduškový čaj	—	—	—

**Tab. 4.3** Přehled zjištěných koncentrací karvakrolu v reálných vzorcích stanovených pomocí spektrofotometrické detekce, elektrochemické detekce s CPE a BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm, ED při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +0,8 V a ED při potenciálu borem dopované diamantové elektrody +1,2 V.

hmotnostní koncentrace $c_g$ (mg l <sup>-1</sup> )			
analyt	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce s CPE	elektrochemická detekce s BDDFE
mateřídouška			
obecná	+	0,13	–
řebříček obecný	+	–	–
Vincentka sirup	–	+	–
Pulmoran- průduškový čaj	–	+	–

**Tab. 4.4** Přehled zjištěných koncentrací thymolu v reálných vzorcích stanovených pomocí spektrofotometrické detekce, elektrochemické detekce s CPE a BDDFE. Kolona LiChroCART 125-4, RP-18e(5µm), dávkováno 20 µl vzorku, mobilní fáze acetonitril a acetátový pufr o pH 5 v poměru 50:50 (V/V), 0,5 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce při 275 nm, ED při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +0,8 V a ED při potenciálu borem dopované diamantové elektrody +1,2 V.

hmotnostní koncentrace $c_g$ (mg l <sup>-1</sup> )			
analyt	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce s CPE	elektrochemická detekce s BDDFE
mateřídouška			
obecná	0,80	0,30	+
řebříček obecný	–	–	–
Vincentka sirup	–	0,34	+
Pulmoran- průduškový čaj	+	0,35	+

## 5. Seznam použité literatury

1. Klouda, P.: Základy biochemie. Ostrava 2000
2. Dvořáková, V.; Valterová, I.; Vaněk, T.: Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy* **105**, 839-845 (2011).
3. Mlejová, V.; Pavlíková, P.; Dobiáš, B.; Adam, M.; Ventura, K.: Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy* **104**, 166-171 (2010).
4. Griffin, S. G.; Markham, J. L.; Leuch, D.: The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* **14**, 322 (1999).
5. Lo Cantare, P.; Shanmugaiah, V.: Antimicrobial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 9454-9461 (2009).
6. In-depth Info. Dostupné z URL <http://www.indepthinfo.com> [cit 28.4.2012].
7. Bühringová, U.: *Léčivé rostliny, obsahové látky, zpracování, základní recepty*. Copyright 2007.
8. Im-Bio-Pharm Consult. Dostupné z URL <http://www.epitesty.cz> [cit 28.4.2012].
9. Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.: Repellent activity of essential oils. *Bioresource Technology* **101**, 372-378 (2009). *CA* **2009**:1156505.
10. *Český lékopis* 2007, 3.díl: léčivé a pomocné látky, léčivé přípravky. Praha, Grada Publishing 2007.
11. Magická síla bylin. Dostupné z URL <http://www.leros.cz> [cit 28.4.2012].
12. Soran, M.-L.; Lung, I.: HPTLC analysis of thymol extracts of *Satureja hortensis* L. obtained by different techniques. *Journal of Planar Chromatography* **23**, 320-322 (2010).
13. Sukhomlinova, E.A.; Shormanov V.K.: Determination of eugenol in biological fluids. *Farmatsiya(Moscow)* **1**, 7-10 (2008). *CA* **2008**:307762.
14. Michelitsch, A.; Rittmannsberger, A.; Hüfner, A.; Rückert, U.; Likussar, W.: Determination of isopropylmethylphenols in Black seed oil by differential pulse voltammetry. *Phytochemical Analysis* **15**, 320-324 (2004).

15. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Ngassaum, M.B.; Eberhardt, R.: Analysis and quality control of essential oil of the leaves of *cinnamomum zeylanicum* from Camerroom. *Ernaehrung (Vienna)* **22**, 443-445 (1988).
16. Vahid, K.; AliReza, F.; Reza, A.; Behvar, A.; Mehdi, J-H.: Multivariate optimization of hydrodistillation-headspace solvent microextraction of thymol and carvacrol from *Thymus transcaspicus*. *Talanta* **79**, 695-699 (2009).
17. Chang, M.J.W.; Ko, C.Y.; Lin, R.F.; Hsieh, L.L.: Biological monitoring of enviroment exposure to safrole and the Taiwanese betel quid chewing. *Archives of Enviromental Contamination and Toxicology* **43**, 432-437 (2002). *CA* **2002**:829647.
18. Solinas, V.; Gessa, C.; Falchi Delitala, L.: High-performance liquid chromatography analysis of carvacrol and thymol in the essential oil of *Thymus capitatus*. *Journal of Chromatography* **219**, 332-337 (1981).
19. Newbery, J.E.; Lopez de Haddab, M.P.: Terpenoid analysis II. The separation of some monoterpene alcohols by High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **260**, 173-176 (1983).
20. Newwbery, J.E.; Lopez de Haddab, M.P.; Charlwood, K.A.: High-Performance Liquid Chromatography of terpenoid alcohols in essential oils. *Analytica Chimica Acta* **147**, 387-391 (1983).
21. Ertan, E.; Aksoy, A.; Guvene, D.; Yucel, A. Cagin: Determination of eugenol contents of some zincoxide-eugenol based dental cements. *Asian Journal of Chemistry* **19**, 3105-3112 (2007). *CA* **2008**:101702.
22. Hudar, M.; Speroni, E. vypsat: GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variatias during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**, 691-700 (2002).
23. Zima, J.; Barek, J.: Uhlíkové pastové elektrody - možnosti a omezení v analýze organických látek. *Chemické listy* **98**, 440-446 (2004).
24. Švancara, I.; Vytřas, K.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické listy* **88**, 412-424 (1999).
25. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické listy* **93**, 440-449 (1999).
26. Švancara, I.; Barek, J.: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii. *Pražské analytické centrum inovací*, 49-58, Praha (2006).

27. Jelínek, I.; Švancara, I.; Yosypchuk B.; Barek, J.: *Senzory*. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2007).
28. Barek, J.; Pecková, K.; Vyskočil, V.: Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii. *Chemické listy* **103**, 889-893 (2009).
29. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204-227 (2009).
30. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické listy* **88**, 138-146 (1994).
31. Zýka, J.: *Nové směry v analytické chemii*. SNTL, Praha 1988.
32. Granger, M.C.; Xu, J.; Strojek, J.W.; Swain, G.H.: Polycrystalline diamond electrodes: basic properties and applications as amperometric detectors in flow injection analysis and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **397**, 145-161 (1999).
33. Compton, P.G.; Foord, J.S.; Marken, F.: Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis* **15**, 1349-1363 (2003).
34. Swain, G.M.; Anderson, A.B.; Angus, J.C.: Applications of diamond thin films in electrochemistry. *MRS Bulletin* **23**, 56-60 (1998).
35. Xu, J.; Granger, M.C.; Chen, Q.; Strojek, J.W.; Lister, T.E.: Boron-doped diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry* **69**, 591A-597A (1997).
36. Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické listy* **103**, 469-478 (2009).
37. Cizek, K.; Barek, J.; Pecková, K.; Fischer, J.; Zima, J.: Voltammetric determination of 3-nitrofluoranthene and 3-aminofluoranthene at boron doped diamond thin-film electrode. *Electroanalysis* **19**, 1295-1299 (2007).
38. Chailapakul, O.; Siangproh, W.; Tryk, D.A.: Boron-doped diamond based sensors: a review. *Sensor Letters* **4**, 99-119 (2006).
39. Mužíková, J.: *Stanovení karvakrolu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí*. Bakalářská práce. Praha (2010).